12 ß-HYDROXYLIERUNG VON ß-METHYLDIGITOXIN IN FERMENTER- UND SUSPENSIONSKULTUREN VON DIGITALIS LANATA

UNTERSUCHUNGEN ZUR NÄHRMEDIUMSOPTIMIERUNG

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Ursula Barthlen

aus Tübingen

1983

12 ß-HYDROXYLIERUNG VON ß-METHYLDIGITOXIN IN FERMENTER- UND SUSPENSIONSKULTUREN VON DIGITALIS LANATA

UNTERSUCHUNGEN ZUR NÄHRMEDIUMSOPTIMIERUNG

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Ursula Barthlen

aus Tübingen

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Februar 1983

Dekan: Prof. Dr. J. Strähle

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Reinhard

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.P.T. Ammon

Herrn Prof. Dr. E. Reinhard
danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und seiner freundlichen Unterstützung bei deren Durchführung.

Herrn Dr. A.W. Alfermann möchte ich besonders für seine immerwährende Hilfsbereitschaft und zahlreichen anregenden Diskussionen danken.

Dem ganzen Arbeitskreis der pharmazeutischen Biologie danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Meinen Eltern
in
Liebe und Dankbarkeit

Wenn ich bei Erforschung naturwissenschaftlicher Gegenstände zu einer Meinung gekommen war, so verlangte ich nicht, daß die Natur mir sogleich recht geben sollte; vielmehr ging ich ihr in Beobachtungen und Versuchen prüfend nach und war zufrieden, wenn sie sich so gefällig erweisen wollte, gelegentlich meine Meinung zu bestätigen.
Tat sie es nicht, so brachte sie mich wohl auf ein anderes Aperçu, welchem ich nachging und welches zu bewahrheiten sie sich vielleicht williger fand.

Goethe

Im Text werden folgende Abkürzungen verwendet:

MS	Murashige und Skoog Medium
NM	Nährmedium
IAA	Indolylessigsäure
PCV	packed cell volume (Frischgewicht)
Upm	Umdrehungen pro Minute
NL	Normalliter (Luft bei Normaldruck, 20°C)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
DC	Dünnschichtchromatographie
TG	Trockengewicht
µS	Mikrosiemens
mosm	Milliosmol
Glyc.	Glycoside
ß-MDt	ß-Methyldigitoxin
ß-MDg	ß-Methyldigoxin
PA	Purpureaglycosid A
∝-MPA	∝-Methylpurpureaglycosid A
Des C	Desacetyl-Lanatosid C
LA	Lanatosid A
Dx	Digitoxose

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung und Problemstellung		1
B	Material und Methoden		8
	1.	Chemikalien	8
	2.	Geräte und Zubehör	9
	3.	Nährmedien	10
	4.	Pflanzenmaterial	13
	5.	Kulturbedingungen	14
	5.1	Suspensionskulturen	14
	5.2	Fermenterkulturen	14
	5.3	Kulturen mit Substratzugabe	14
	6.	Probenaufarbeitung	15
	6.1	pH-Messung	15
	6.2	Sedimentationsvolumen (PCV)	15
	6.3	Glucosebestimmung	15
	6.4	Leitfähigkeitsmessung	15
	6.5	Osmolarität	15
	6.6	Trockengewichtsbestimmung	16
	7.	Ionenbestimmung	16
	7.1	Nitrat	16
	7.2	Calcium/Magnesium	17
	7.3	Sulfat	17
	7.4	Ammonium	18
	7.5	Phosphat	18
	7.6	Natrium/Kalium	19
	8.	Analytik der Glycoside	20
	8.1	Extraktion der Glycoside aus Nährlösung und Gewebe	20

	8.2	Gehaltsbestimmung der Extrakte mit DC	20
	8.3	HPLC - Messung	21
	8.3.1	Programm zur direkten Messung von ß-MDt/ ß-MDg aus dem Nährmedium	21
	8.3.2	Fluorimetrie/HPLC - Vergleich	23
C	Ergebnisse		26
	1.	Hydroxylierung im Licht bei unterschiedlichem ß-MDt-Angebot	26
	2.	Wachstumsfermenter mit im Dunkeln gehaltenen Vorkulturen	31
	3.	Fermentation im Dunkeln mit ß-Methyldigitoxin	35
	4.	Selektion von Zellinien mit erhöhtem Wachstum	40
	5.	Fermentation mit unterschiedlichem Phosphatgehalt mit und ohne Casein	46
	5.1	Vorversuche im Schüttelkolben	46
	5.2	Fermentation im Vollmedium mit 340 mg/l KH_2PO_4	49
	5.3	Fermentation im Vollmedium ohne Casein mit 170 mg/l KH_2PO_4	49
	5.4	Fermentation im Vollmedium ohne Casein mit 340 mg/l KH_2PO_4	52
	6.	Hydroxylierung im caseinfreien Vollmedium durch Dunkelkulturen	56
	7.	Fermentation durch Nachfüttern von Phosphat	59
	7.1	KH_2PO_4 - Fermentation	59
	7.2	$(NH_4)H_2PO_4$ - Fermentation	62
	7.3	Ergebnisse	62
	8.	Methyldigitoxingewöhnungsversuche	64
	8.1	Zugabe von unterschiedlichen ß-MDt-Mengen	64
	8.2	Dauergewöhnung an 40 mg/l ß-MDt auf einem caseinfreien Medium	64
	8.3	Kontinuierliche Zugabe von ß-MDt	67
	8.4	Selektion aus 8.3	67
	8.5	Methanolzugabe	67
	8.6	Ergebnisse und Dikussion	70

9.	Stammhaltung im Hinblick auf die Hydroxylierungsstabilität	73
10.	Untersuchungen der Makroelemente	76
10.1	Beobachtungen der Makroelemente während einer Passage	77
10.2	Verbrauch der Makroelemente im Wachstumsfermenter	80
10.3	Verbrauch der Makroelemente in einem Fermenter mit ß-MDt-Zugabe	84
10.4	Ionenbestimmung im 200 l-Fermenter mit ß-MDt-Zugabe	89
10.5	Ergebnisse des 200 l-Fermenters und Diskussion	92
11.	Hydroxylierung bei Zellkulturen auf unterschiedlichem Wasser	95
11.1	Bidestilliertes Wasser	95
11.2	Bidestillat mit Zusatz von Leitungswassersalzen	95
11.3	Versuche auf Leitungswasser mit und ohne Casein	96
11.4	Diskussion	99
12.	Abhängigkeit der Hydroxylierung und der Lebensdauer von Mediumsbestandteilen im Langzeitversuch	100
12.1	Zugabe von Phosphat/Ammonium/Glucose	100
12.1.1	Ergebnisse	105
12.2	Zugabe von Mediumsbestandteilen	107
12.3	Zugabe von $MgSO_4$, $CaCl_2$, KNO_3	109
12.4	Ergebnisse und Diskussion	110
13.	Medien mit unterschiedlichen anorganischen Stickstoffquellen	112
13.1	MS-Medium mit 20 mmol und 40 mmol NO_3-N als KNO_3	112
13.2	MS-Medium mit je 20 mmol und 40 mmol NH_4-N und NO_3-N	115
13.3	Ergebnisse und Diskussion	117
14.	Hydroxylierung in Abhängigkeit von der Einwaage und der Glucosekonzentration	120

14.1 Abhängigkeit der Hydroxylierung von der Einwaage 120
14. 2 Änderung der Glucosekonzentration im Vollmedium 122
14.3 Hydroxylierung in reinen Glucoselösungen und mit Zusatz der Makroelemente 122
14.4 Ergebnisse und Diskussion 126
D Zusammenfassung der Ergebnisse 129
E Literaturverzeichnis 132

A Einleitung und Problemstellung

Pflanzen stellen trotz aller Fortschritte in Chemie und Technik nach wie vor eine äußerst wichtige Rohstoffquelle für den Menschen dar, und es bietet sich an, das biologische Potential zur Produktion von Naturstoffen aus Zellkulturen zu nutzen.
Über die ersten Bemühungen, pflanzliche Zellen in Kultur zu bringen, berichtete schon 1902 HABERLANDT.
Inzwischen ist der Einsatz von Zellkulturen, vor allem für die Gewinnung von pharmazeutisch wichtigen Verbindungen, sogar industriell möglich.
Die biotechnische Gewinnung besitzt den Vorteil, unabhängig von landwirtschaftlichen Anbauproblemen, von politischen und wirtschaftlichen Krisen, von Jahreszeit und Pflanzenkrankheiten zu sein.

Zellkulturen lassen sich aus dem Wundgewebe von Blättern, Stengeln, Wurzeln und Antheren erhalten.
Diese Pflanzenzellen vermehren sich unabhängig von der Ausgangspflanze in einem geeigneten sterilen Nährmedium unbegrenzt weiter, und jede Zelle enthält alle Erbanlagen, um unter geeigneten Bedingungen, wieder zu einer ganzen Pflanze ausdifferenzieren zu können.
Durch Veränderung der Umweltbedingungen und des Nährmediums, lassen sich die Aktivitäten der undifferenzierten Zellen beliebig steuern, so daß Stoffwechselprodukte der Pflanzen, die pharmazeutisch wichtig sind, erzeugt werden können.

In vitro kultivierte Pflanzenzellen zeigen ein enormes Potential, organische Stoffe auszubilden, wie nur einige Beispiele zeigen:
Ajmalicin und Serpentin aus Catharanthus roseus (DÖLLER et al. 1976), Coffein aus Coffea arabica (BUCKLAND et al. 1975), Diosgenin aus Dioscorea deltoidea (KAUL und STABA 1968), Reserpin aus Rauwolfia serpentina (MITRA und KAUL 1964), Ginsengsaponine aus Panax ginseng (FURUYA und ISHII 1972).

Die Cardenolidproduktion in der Gewebekultur dagegen korreliert mit der Ausdifferenzierung zu Pflanzenorganen, so daß zwar bei frisch angelegtem Blattkallus noch Glycoside nachzuweisen sind, diese aber bei Weiterkultivierung verschwinden (KARTNIG et al. 1976).
Auch ZENK et al. (1977 a) haben bei Catharanthus roseus festgestellt, daß nach der Isolation, im Laufe der Subkultivierung, die biosynthetische Kapazität, Sekundärstoffe ausbilden zu können, vollständig verloren gegangen ist.
Die Hauptursache scheint, daß die Ausnutzung der für die Sekundärstoffproduktion verantwortlichen genetischen Information, unterdrückt wird (TEUSCHER 1973).
YOSHIKAWA und FURUYA (1982) stellten auch bei Gewebekulturen von Schlafmohn keine Alkaloidproduktion mehr fest. Sobald sich der Kallus aber in Knospen und Wurzeln differenzierte, bildeten sich Codein, Thebain und Morphin.
Die einzelnen autonomen Zellen haben die Fähigkeit, Metabolite zu bilden jedoch nicht verloren, die Enzyme dazu müssen nur aktiviert werden. So gelang es RÜCKER et al. (1981), durch Änderung des Hormonangebots, eine Herzglycosidneubildung in undifferenziertem Kallusgewebe zu induzieren.

Manche Zellkulturen sind in der Lage, Sekundärstoffe in einem Umfang zu akkumulieren, der weit über das in der entsprechenden Pflanze gefundene Maß hinausgeht:
So gewann FUJITA et al. (1981) über 1,4 g/l Shikonin aus Lithospermum erythrorhizon. HINZ und ZENK (1982) erreichten die Menge von 2,7 g/l Berberisalkaloide aus Berberis stolonifera.

Coleus blumei-Suspensionskulturen bildeten sogar 5mal mehr Rosmarinsäure, als die differenzierte Pflanze, insgesamt 3,6 g/l (ZENK 1977 b).

Es ist sogar möglich, eine Zellkultur so zu manipulieren, daß sie neue Metabolite bildet, die bis jetzt in der intakten Pflanze noch nicht gefunden wurden:
Zum Beispiel berichtete ALLISON (1968) über Paniculide, neue Sesquiterpenlactone aus Andrographis paniculata. 1975 entdeckte LEISTNER Lucidin, ein Antrachinon in Morinda citrifolia, und 1982 isolierten STÖCKIGT und PAWELKA das Indolalkaloid Voafrin aus Voaconga africana. MIZUSAKI et al. (1971) fanden in Tabak-Kulturen neue Putrescin-Derivate.

Neben der Möglichkeit natürliche Produkte der Pflanzen in Zellkulturen zu erzeugen, kann man auch die Syntheseleistung der Pflanzenzellen für die chemische Transformation eines zugesetzten natürlichen oder fremden Stoffes nutzen. Diese Biotransformationsfähigkeit von kultivierten Pflanzenzellen zeigt sich bei verschiedensten Zellkulturen:
Pfefferminzkulturen zum Beispiel, reduzieren Pulegon zu Isomenthon (AVIV und GALUN 1978), Pregnolon wird von Tabakzellen zu Progesteron umgeformt (GRAVES und SMITH 1967). Auch über eine Biotransformation von Thebain zu Codein durch Schlafmohnkulturen wurde von GRÜTZMANN und SCHRÖTER (1966) berichtet. Zellkulturen von Karotten sind sogar fähig, Steroide, wie das Digitoxigenin, zu Periplogenin zu hydroxylieren, das ursprünglich sonst nur in Strophantussamen vorkommt (JONES et al. 1978).
Auch die Digitaliszellen haben die Fähigkeit, gewisse Stoffwechselwege der intakten Pflanze zu realisieren und zugesetzte Herzglycoside enzymatisch zu verändern (REINHARD 1974, FURUJA et al. 1970).

Die einzige Quelle für das Herzglycosid Digoxin stellt Digitalis lanata aus der Familie der Scrophulariaceae dar, welches in den letzten Jahren das am meisten verwendete

Mittel gegen Herzinsuffizienz geworden ist.
In Deutschland stehen ß-Methyldigoxin neben ß-Acetyldigoxin, an führender Stelle aller Fertigarzneimittel, die auf ärztliche Verordnungen verschrieben werden (GKV-Arzneimittelindex von Januar bis September 1981).

Der mengenmäßige Hauptinhaltsstoff des wolligen Fingerhuts ist Lanatosid C. Bei der Aufarbeitung der Droge entsteht neben Digoxin Digitoxin, das als hauptsächlichstes Nebenprodukt in großen Mengen anfällt.
Die wichtigste Biotransformation des eingesetzten ß-methylierten Digitoxins ist die 12 ß-Hydroxylierung zu dem therapeutisch wertvollen ß-Methyldigoxin (REINHARD et al. 1975), dessen Formel in Abbildung 1 dargestellt ist.

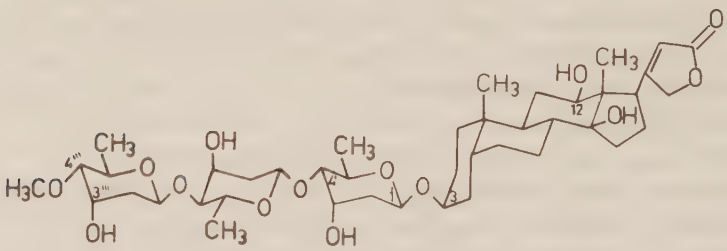
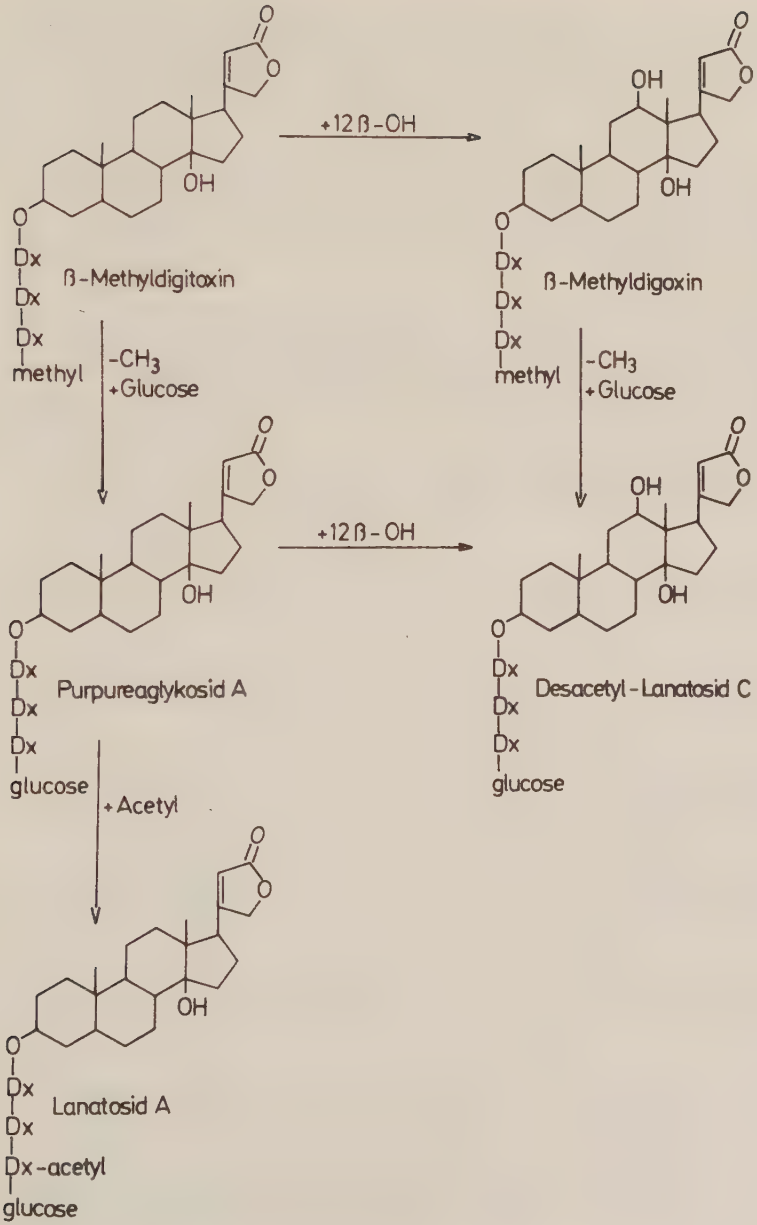


Abbildung 1: ß-Methyldigoxin

Weiterhin kommen folgende Reaktionen vor:
Demethylierung, gefolgt von Glucosidierung an der C-4-Position der äußersten Digitoxose zu Purpureaglycosid A oder zusätzliche Acetylierung am C-3 der endständigen Digitoxose zu Lanatosid A. Die 12 ß-Hydroxylierung von Purpureaglycosid A führt zu Desacetyl-Lanatosid C (Abbildung 2).

Abbildung 2: Mögliche Reaktionen bei Zusatz von ß-MDt zu Digitalis lanata-Zellkulturen: Hydroxylierungen, Demethylierungen, Glucosidierungen und Acetylierungen


+12 ß-OH
ß-Methyldigitoxin
ß-Methyldigoxin
-CH3
+Glucose
Purpureaglykosid A
Desacetyl-Lanatosid C
+Acetyl
Lanatosid A
Dx
methyl
glucose
Dx-acetyl
OH
O

Um die Biotransformation durch Pflanzenzellen zur biotechnologischen Ausnutzung heranzuziehen, ist es wichtig, die Ergebnisse vom Schüttelkolben in größeren Bioreaktoren zu reproduzieren.
Zum ersten Mal arbeiteten TULECKE und NICKELL (1959) mit Fermentern im 10 l-Maßstab mit Paul´s Scarlet Rose Zellen. Die Experimente mit Digitalis lanata Zellen erfolgten im Airliftfermenter nach WAHL (1977) mit einem Arbeitsvolumen von 20 l.
Ein Vorteil von Digitalis Zellkulturen, im Falle der Biotransformation, ist, daß sie das Produkt in das Medium abgeben, aus dem es leicht wiedergewonnen werden kann.
Aus dem hochselektionierten Stamm 287 konnten bis jetzt zufriedenstellende Mengen bis zu 475 mg/l ß-MDg innerhalb von 14 Inkubationstagen erzielt werden (HELMBOLD 1979).

Der große Nachteil bei Pflanzenzellkulturen ist das langsame Wachstum und das teure Nährmedium, das die biotechnologische Anwendung im untersuchten Beispiel nur dann wirtschaftlich macht, wenn der Energieverbrauch gesenkt wird, das Wachstum und die Hydroxylierung gesteigert wird und beim Nährmedium Einsparungen gemacht werden können.
Unter diesem Gesichtspunkt sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Problemstellungen angegangen werden:
- Eine Beleuchtung, in Fermentern bis zu 200 l und mehr, ist nur unter großen Schwierigkeiten und immensen Kosten zu ermöglichen, zumal noch die Wärme der Lichtquelle ein zusätzliches Problem wäre.
Hier war zu untersuchen, ob ein Übergang von den zunächst verwendeten Lichtkulturen zur Kultivierung im Dauerdunkel, ohne Einbußen bei der Leistungsfähigkeit der Kulturen möglich ist.
- Um die Fermentationskosten bezüglich des Nährmediums gering zu halten, war es angezeigt, dessen Zusammensetzung einer Überprüfung zu unterwerfen, um beurteilen zu können, inwieweit die einzelnen Bestandteile für die Hydroxylierung essentiell sind.

- Daraus folgert auch, daß versucht werden mußte, durch unterschiedliche Zugabe von bestimmten Nährmediumskomponenten eine Steigerung des Wachstums zu erhalten, um in noch kürzerer Zeit zur gewünschten Zellmasse zu gelangen.
- Bei Gewebekulturen, die ihre Energie ausschließlich aus dem Nährmedium beziehen, ist es außerordentlich wichtig, dieses auf die unterschiedliche Abnahme der Makroelemente hin zu untersuchen, um gezielt fehlende und notwendige Bestandteile nachfüttern zu können.
- Auch wäre zu erwägen, den Kultivierungsprozeß in zwei Schritte zu unterteilen, nämlich in eine Wachstumsphase und in eine Hydroxylierungsphase, um für beide jeweils ein eigenes auf die entsprechenden Bedürfnisse optimiertes Nährmedium anzubieten.
- Um gleichbleibende Fermentationserfolge zu erreichen, sollten die Subkulturen über längere Zeit in möglichst vielen Parametern untersucht werden.

B Material und Methoden

1. Chemikalien

Nährmedium nach MURASHIGE & SKOOG (1962) ohne Saccharose, Indolylessigsäure und Kinetin	Flow Laboratories, Irvine/Schottland
Caseinhydrolysat	Difco Laboratories, Detroit Michigan/USA
Glucose	Maizena, Heilbronn
Glucoseoxidase	Beckman, München
Purpureaglycosid A	Sandoz, Basel/Schweiz
ß-Methyldigitoxin ß-Methyldigoxin Desacetyl-Lanatosid C	Boehringer, Mannheim

Alle anderen, hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in analysenreiner Form von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

2. Geräte und Zubehör

Schüttelmaschinen	Infors, Basel/Schweiz
Airliftfermenter	Eigenbau (WAHL 1977)
Fermenterzubehör	
pH/O_2-Elektroden Typ 465	Ingold, Frankfurt
pH/O_2-Meß- und Registriergerät	Braun, Melsungen
Luftsterilfilter 0,2 µm	Pall, Sprendlingen
Thermostat	Lauda, Lauda-Königshofen Braun, Melsungen
Membranpumpen Fe 211	
Membranpumpenköpfe	Braun, Melsungen
Kleinströmungsmeßgeräte	Krohne, Duisburg
Sterilfilter SM 16510	Sartorius, Göttingen
Membranfilter	Flow, Bonn Schleicher + Schüll, Dassel
Glucoseanalysator	Beckman, München
pH-Meter	Knick, Berlin
Leitfähigkeitsmeßgerät	Corning, Halstead/England
Gefriertrocknungsanlage Delta IA	Christ, Osterode
Hochdruckflüssigkeitschromatograph 1084 B	
LC-Terminal 79850 B	Hewlett Packard, Frankfurt
HPLC-Säulen	Knauer, Bad-Homburg
Spektralphotometer zur Fluoreszenzmessung PM Q II	Zeiss, Oberkochen
Integrator CRS 309	Infotronics, Shannon/Irland
Digitalspektralphotometer	Zeiss, Oberkochen
Halbmikro-Osmometer	Knauer, Bad Homburg
Flammenphotometer	Lange, Berlin

3. Nährmedien

Als Grundlage wurde ein modifiziertes Murashige und Skoog Medium verwendet. Das Auxin/Kinetin-Verhältnis wurde nach Optimierungsversuchen von HAGEDORN (1977) übernommen.

Grundmedium:

Makroelemente	mg/l	mmol/l
NH_4NO_3	1650	20,6
KNO_3	1900	18,8
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	440	3,0
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	370	1,5
KH_2PO_4	170	1,25
Mikroelemente	**mg/l**	**µmol/l**
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	37,2	100
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	27,8	100
H_3BO_3	6,2	100
$MnSO_4 \cdot 1\ H_2O$	16,9	100
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	8,6	30
KI	0,83	5
$NaMoO_4 \cdot 1\ H_2O$	0,25	1
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	0,025	0,1
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,025	0,1

Organische Substanzen	mg/l
Thiaminiumdichlorid	0,1
Nicotinsäure	0,5
Pyridoxolhydrochlorid	0,5
Glycin	2,0
myo-Inosit	100,0
Caseinhydrolysat vitaminfrei	1000,0
Indolylessigsäure (Auxin)	1,0
6-Furfurylaminopurin (Kinetin)	2,0
Glucose . 1 H_2O	22,0 g/l

HAGEDORN, W., Tübingen, unveröffentlicht

P - Medium

Dieses Medium entspricht dem Grundmedium, nur der Phosphatanteil wurde auf 340 mg/l erhöht.

PLW - Medium

Das P-Medium wurde hierzu, statt mit bidestilliertem Wasser mit Leitungswasser angesetzt.

oCP - Medium

Hierzu wurde das Grundmedium ohne Caseinhydrolysat verwendet und der Phosphatanteil wurde auf das Doppelte erhöht.

oCPLW - Medium

Statt bidestilliertem Wasser wurde hier Leitungswasser verwendet (Leitfähigkeit bei 24°C : 300 µS/cm), sonst entspricht es dem oCP-Medium.

LP - Medium

Zum Grundmedium wurden hier zusätzlich Salze zugegeben, die im Leitungswasser enthalten sind, nicht aber im Medium nach Murashige und Skoog.
In folgender Aufstellung ist ein Vergleich der Salzkonzentrationen von Bodenseewasser (Jahresmittelwerte 1980) und des MS-Mediums gezogen.
Gleichzeitig wird die Form des Salzes angegeben, mit dem das Grundmedium supplementiert wurde (LP-Medium).
Arsen, Selen, Chrom und Nitrit wurden nicht ins LP-Medium aufgenommen.

	Bodenseewasser mg/l	MS-Medium mg/l	Zugabeform mg/l
Calcium	46,0	120	
Magnesium	7,8	36	
Natrium	4,0	4,6	
Kalium	1,3	782	
Strontium	0,4	-	$SrCl_2 \cdot 6H_2O$
Chlorid	4,4	213	
Phosphat	0,08	119	
Silikat	0,94	-	Nasilikat . $6H_2O$
Nitrat	2,8	2434	
Sulfat	32,9	166	
	µg/l	µg/l	µg/l
Kupfer	1,0	6	
Bor	20,0	1081	
Barium	23,0	-	$BaCl_2$
Lithium	2,0	-	LiCl
Ammonium	13,0	371000	
Nitrit	19,0	-	
Eisen	2,1	5600	
Mangan	0,5	5500	
Aluminium	1,5	-	$Al_2(SO_4)_3$ $18H_2O$
Zink	3,6	1900	
Kobalt	0,5	6	
Nickel	1,0	-	$NiSO_4 \cdot 6H_2O$
Arsen	1,6	-	
Selen	0,1	-	
Chrom	0,3	-	
Cadmium	0,05	-	
Molybdän	-	96	
Jod	-	630	

Alle Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, mit bidestilliertem Wasser angesetzt.
Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren auf pH 5,5 eingestellt.

Sterilisation

Die Nährmedien im Erlenmeyerkolben und Fermenter wurden im Autoklaven (Fedegari, Pavia/Italien 1290 E) 20 min bei 121°C sterilisiert.
Pipetten, Leergefäße und Sterilfilter wurden mit Heißluft 30 min lang bei 180°C erhitzt.

Aufbewahrung der Nährmedien

Nachdem YAMAKAWA et al. (1979) in einem ausführlichen Versuch getestet hatten, daß Indolylessigsäurelösung (IAA), bei einem pH von 4 bis 10, Autoklavieren von 130°C und langer Schütteldauer, sowie Belüften, im Fermenter nicht zersetzt wird, konnte IAA ohne Bedenken mit dem Medium zusammen sterilisiert werden.
Doch Licht unterschiedlicher Intensität hatte den größten Einfluß auf die IAA-Zersetzung. Im Dunkeln wurde keine Gehaltsabnahme gemessen.
Aus diesem Grunde wurden alle Medien, sobald sie autoklaviert waren, in einem dunklen Raum abgekühlt und aufbewahrt.

4. Pflanzenmaterial

Zur Bearbeitung kam der Zellstamm 287 T von Digitalis lanata Ehrh., aus der Familie der Scrophulariaceae.
Auf Agar gehaltenes Kallusgewebe von Hochleistungspflanzen wurde in Suspension genommen.

5. Kulturbedingungen

5.1 Suspensionskultur

Zur Stammerhaltung wurde das Zellmaterial im Schwachlicht bei 1000 Lux (Osram L 15 W/25 - 2 -Leuchtstoffröhren) oder im Dauerdunkel, in Schüttelmaschinen bei einer Frequenz von 100 Upm und einer Temperatur von 24°C ∓ 1°C, kultiviert.
Das Umimpfintervall lag bei einer Woche (1 Passage).
Die Inoculummenge bestand aus 30 g Frischgewicht, die in einen 1000 ml Erlenmeyerkolben mit 300 ml Nährlösung gegeben wurde.

5.2 Fermenterkulturen

Die Fermentationsversuche wurden bei einem Arbeitsvolumen von 20 l, bei Raumbeleuchtung, oder im Dunkeln durchgeführt.
Bei 24°C ∓ 1°C lag die Inkubationstemperatur, und die Belüftungsrate wurde bei 350 Nl Luft/h gehalten.
Der Volumenverlust, der durch Probenahme und Durchlüftung entstand, wurde mit Wasser wieder auf 20 l ergänzt.
Sofern es notwendig war, wurde als Antischaum eine Suspension von 1,5 g Polypropylenglykol 2025 in 600 ml Wasser zugesetzt. Ein Versuch mit Olivenöl hatte sich nicht bewährt.
Wenn nicht anders angegeben, wurden die Fermenter mit jeweils sechs 1 l-Erlenmeyerkolben, mit 300 ml Suspensionskultur, inoculiert.

5.3 Kulturen mit Substratzugabe

Für Versuche im Erlenmeyerkolben wurde ß-MDt in Methanol 80% gelöst, sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm), und mit einer sterilen Pipette direkt in den Kolben eingetropft, sodaß eine Konzentration von 40 mg/l ß-MDt erreicht wurde.
Nach 7 Tagen wurde die Umsatzrate zu ß-MDg gemessen.

Bei den Fermentern erfolgte die Substratzugabe, die vorher in ein Vorlagegefäß sterilfiltriert wurde, über eine Pumpe, die durch eine Zeitschaltuhr so gesteuert wurde, daß eine gleichmäßige Versorgung mit ß-MDt über 24 Stunden hinweg, gewährleistet war.

6. Probenaufarbeitung

6.1 pH-Messung

Der pH wurde entweder innerhalb des Fermenters mittels einer pH-Elektrode, oder auch extern mit einer Glaselektrode bestimmt.

6.2 Sedimentationsvolumen (PCV)

Die gut gemischte Probe wurde in einen 100 ml Meßzylinder gegeben, und nach 20 min Absetzzeit, wurde der Quotient aus Sedimenthöhe zur Gesamthöhe x 100 als Sedimentationsvolumen bestimmt.

6.3 Glucosebestimmung

Der Glucosegehalt des zellfreien Mediums wurde mit einem Glucoseanalysator nach der GOD-Methode gemessen.
Die Nährlösung wurde so verdünnt, daß in einem Bereich von 50 bis 500 mg Glucose/100 ml gemessen werden konnte.

6.4 Leitfähigkeitsmessung

Mit einer Elektrode wurde bei 24^{o}C, im Medium, direkt die Leitfähigkeit als µS/cm bestimmt.

6.5 Osmolalität

Über die Gefrierpunktserniedrigung wurde die Osmolalität der Probenlösung, auf den in Milliosmol/kg geeichten Osmometer, bestimmt.

6.6 Trockengewichtsbestimmung

Durch Filtration wurde die Probe in Kulturfiltrat und Gewebe getrennt. Das Gewebe wurde gefriergetrocknet und anschließend das Trockengewicht bestimmt.

7. Ionenbestimmung

7.1 Nitrat

Nitrat muß immer in der frischen Probe gemessen werden.
Nach der Methode von SAWICKI und SCARINGELLI (1971), wird Nitrat mit Hydrazinsulfat in alkalischer Lösung, mit Kupfer als Katalysator, zu Nitrit reduziert, das mit Sulfanilamid, als einem primären aromatischen Amin, zum Diazoniumsalz reagiert.
Als Kupplungskomponente dient N-Naphtyl-(1)ethylendiammoniumdichlorid (NEDD), und es entsteht ein intensiv gefärbter Azofarbstoff, der mit dem Photometer gemessen wird.
Um die Farbe für die Messung reproduzierbar stabil zu halten, wurde vor Zugabe der Diazolösung Aceton zugegeben.
Bei jeder Messung wurde ein Standard und frische Nährlösung mitgemessen.

Mikroreduktionsmethode:
4 ml der Nährlösung (1 : 1000 verdünnt)
0,2 ml Kupfersulfatlösung (entspricht 50 µg Kupfer)
1 ml 0,1 N Natronlauge
0,2 ml Hydrazinsulfatlösung (0,21% in Wasser)
werden gemischt und 30 min bei 65°C erwärmt
5 min im Eisbad gekühlt
dazu kommt dann:
0,4 ml Acetonreagenz (10% in Wasser)
1,2 ml Diazolösung (bestehend aus 10% Phosphorsäure (85%), 4% Sulfanilamid und 0,2% NEDD, in Wasser)
Es wird mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt.
Nach 15 min wird der violette Komplex bei 540 nm gegen eine Blindprobe gemessen.

7.2 Calcium/Magnesium

Beide Ionen können nebeneinander komplexometrisch bestimmt werden.
Calcium läßt sich bei pH 12 unter Verwendung von Murexid als Indikator mit Ethylen-dinitrilotetraacetat-dinatriumsalz (Titriplex III) titrieren.
Nach Verkochen von Murexid wird bei pH 10 mit Eriochromschwarz als Indikator weiter das Magnesium titriert.
Störende Schwermetalle werden mit Kaliumcyanid maskiert.

Ausführung:
10 ml Probe werden mit 10 ml Wasser verdünnt.
Nach Zugabe von einer Spatelspitze Kaliumcyanid,
1 ml 1 N NaOH
und einigen Körnern einer Murexid/NaCl Verreibung 1 : 100,
wird mit 0,05 M Titriplex III von rot nach violett titriert.
Mit 0,5 ml 32% Salzsäure wird der Murexidindikator verkocht, und mit Ammoniak, in dem Eriochromschwarztabletten aufgelöst sind (2 Pufferindikatortabletten in 40 ml NH_3 25% und 10 ml Wasser)
auf pH 10 gebracht.
Anschließend wird mit obiger Titriplex III-Lösung von weinrot nach grün titriert.

7.3 Sulfat

Hier hat sich die Mikrotitration nach FRITZ und YAMAMURA (1955) mit Thorin als Indikator als beste Bestimmung bewährt.

Ausführung:
5 ml Medium werden zur Fällung des störenden Phosphats mit 100 mg Magnesiumcarbonat und 10 Tropfen einer 1% Perchlorsäure 5 min gekocht.
Nach dem Abkühlen auf 10°C wird direkt auf eine Glassäule (15 mm lichte Weite, 200 mm Länge), die mit 100 mm stark

saurem Ionenaustauscher gefüllt ist, filtriert, um störende Kationen zu entfernen.
10 ml Eluat werden mit 40 ml Ethanol und 10 ml Sullfatstandardlösung (370 mg/l $MgSO_4$) versetzt.
Um den Umschlagspunkt besser sichtbar zu machen, wird zu Thorin (0,2% in Wasser) noch Methylenblau (0,0125% in Wasser) zugegeben, so daß jetzt mit 0,005 M Bariumperchloratlösung von grün nach rosa titriert werden kann.

7.4 Ammonium

Da nur geringe Mediumsmengen pro Probe zur Verfügung standen, wurde die Methode, mit einer ionenselektiven Elektrode Ammonium zu messen, verlassen und auf die photometrische Bestimmung übergegangen. Zeit und Materialaufwand sind hier minimal.
Nach Alkalisieren reagiert Ammoniak mit Hypochlorit zu Monochloramin, das in einer katalysierten Reaktion mit Phenollösung, ein blaues Indophenol bildet (BERTHELOT 1856).

Ausführung:
0,2 ml Probe (1 : 10 verdünnt) werden mit 5 ml Phenollösung (Phenol 9,98 g, Nitroprussidnatrium 0,051 g, Natriumchlorid 200 mg, mit Wasser auf 1 l auffüllen) gemischt.
Nach Zugabe von 5 ml Hypochloritlösung
(0,5 ml Natriumhypochlorit mit 13% Chlor, 0,75 ml 8,25 N NaOH, mit Wasser auf 1 l auffüllen)
wird 30 min bei 36°C erwärmt,
15 min abgekühlt
und anschließend gegen einen Blindwert bei 570 nm photometrisch gemessen.

7.5 Phosphat

Das im Medium vorliegende anorganische Phosphat bildet mit Natriummolybdat Phosphormolybdat.
Durch Reduktion mit p-Methylaminophenolsulfat wird das

Phosphormolybdat in kolloidales Molybdänblau übergeführt, welches proportional der Menge des vorhandenen Phosphats ist. Der Komplex wird photometrisch erfaßt (Gomorri 1942).

Ausführung:
1 ml Probelösung wird mit 4 ml schwefelsaurer Ammoniummolybdatlösung versetzt
(50 ml H_2SO_4 10 N, 100 ml $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 2,5% und 650 ml H_2O)
und mit 0,5 ml Reduktionslösung bestehend aus:
(40 g Natriumdisulfit, 1 g Methylaminophenolsulfat(Photorex), auf 100 ml Wasser auffüllen) zur Reaktion gebracht.
Nach Auffüllen mit Wasser auf 10 ml wird die blaue Lösung nach 30 min bei 660 nm gegen einen Blindwert gemessen.

7.6 Natrium/Kalium

Beide Alkalimetalle können mittels Flammenphotometrie bestimmt werden.
Um die Querempfindlichkeit und gegenseitige Anregungsbeeinflussung gering zu halten, wird nach SCHUHKNECHT und SCHINKEL (1962) Caesiumchlorid/Aluminiumnitrat mitversprüht.

Ausführung:
Die 1 : 50 verdünnte Nährlösung wird in eine Acethylen-wasserflamme versprüht.
Die entstehenden Atome emittieren eine charakteristische Spektrallinie (Kalium λ = 768 nm, Natrium λ = 589 nm), die durch Filter isoliert werden.
Auf Grund des Mittelwertes mehrerer Einzelmessungen wird der Gehalt an Na/K-Ionen aus der Eichkurve entnommen.
Bei der Messung von Natrium muß berücksichtigt werden, daß in dem Casein, das dem Nährmedium zugesetzt wurde, bis zu 200 mg/l Na enthalten ist. Deshalb muß für jede Caseincharge eine neue Eichkurve erstellt werden.

8. Analytik der Glycoside

8.1 Extraktion der Glycoside aus Nährlösung und Gewebe

50 ml Probe wird durch Filtration in Zellgewebe und Kulturfiltrat getrennt.
Mit 100 ml Methanol 80% wird das Gewebe 20 min am Rückfluß gekocht, abgesaugt und mit 2 x 33 ml Methanol 80% gewaschen.
Der Methanolextrakt wird noch mit 67 ml H_2O,
5 ml Ammoniumsulfatlösung 30% versetzt und
4mal mit je 40 ml Chloroform ausgeschüttelt.
Die Nährlösung wird nach Zusatz von 50 ml Wasser und
134 ml Methanol 4mal mit je 40 ml Chloroform extrahiert.
Die vereinigten Chloroformphasen werden am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt.
Anschließend löst man den Rückstand in Chloroform/Methanol (9 : 1) und füllt in ein Glas mit 6 ml Eichmarke um.

8.2 Gehaltsbestimmung der Extrakte mit DC

Von den Gewebe- und NM-Extrakten werden 1 bis 12 µl punktförmig auf DC-Kieselgelplatten ohne Fluoreszenzindikator (Merck, Darmstadt) aufgetragen.
Die Entwicklung erfolgt in einem Gemisch aus Chloroform/Methanol/Wasser 80 : 18 : 2 (Pharm. Helv. VI).
Zum Abdampfen der Lösungsmittel werden die Platten 30 min bei 150°C erhitzt und anschließend in ein Reagens nach JENSEN (1953) und KAISER (1955) getaucht.
Reagens: 15 Teile Trichloressigsäure 25% in Ethanol 99%
1 Teil Chloramin T 5% in Wasser
Die bei 4°C gelagerten Lösungen werden vor dem Gebrauch gemischt.
Im Heizschrank wird bei 150°C abgeraucht und die Intensität der Substanzflecke auf der erkalteten Platte, durch Fluoreszenzmessung im Spektralphotometer bestimmt (HAMMERSTEIN und KAISER 1972).
Die Fluoreszenzfarbe ist vom Aglykon abhängig: Digitoxige-

ninderivate fluoreszieren gelb, Digoxigeninderivate blau. Da zahlreiche Faktoren die Meßergebnisse beeinflussen, und die Fluoreszenzintensität bei gleicher Konzentration von Platte zu Platte schwankt, ist es nicht möglich, eine einmal aufgestellte Eichkurve für alle Messungen zu verwenden. Zur quantitativen Bestimmung müssen daher auf jede Platte neben den Extrakten Eichstandards bekannter Konzentration aufgetragen werden.
Die Meßwerte werden mittels Integrator und Schreiber registriert.

8.3 HPLC-Messung

Für die dünnschichtchromatographische Auswertung einer Fermenterprobe war durchschnittlich ein halber Tag notwendig.
So wurde dringend nach einer zeitsparenden und genauen Analysenmethode gesucht.
ZIMMERLE (1980) entwickelte ein Gradientenprogramm für die Elution der Herzglycoside im HPLC, das im folgenden mit geringen Abweichungen beibehalten wurde.

8.3.1 Programm zur direkten Messung von ß-MDt/ß-MDg aus dem Nährmedium

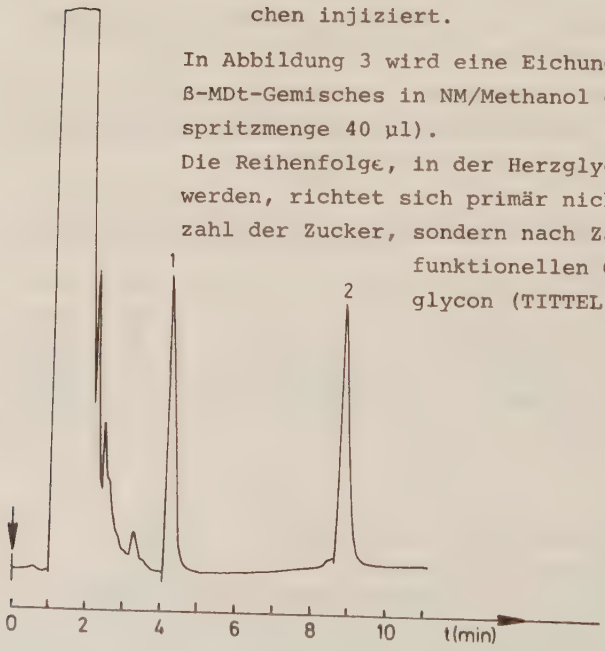
Der Vorteil dieser Methode ist, daß man ohne großen Aufwand mit der Probenvorbereitung zu haben, direkt das Kulturfiltrat der Fermenterbrühe, oder andere Nährlösungen, einspritzen kann.

Programm:
Stationäre Phase: Merck LiChrosorb RP 8, 7 µm
Säulen: Hauptsäule: 250 x 4,6
Vorsäule : 40 x 4,6 (Knauer, Bad Homburg)

ZIMMERLE, T., 1980 Tübingen, unveröffentlicht

Mobile Phase: Acetonitril/Wasser 40 : 60
Gradientenprogramm von 40% auf 50% Acetonitril bis min 5, danach isokratisch bis min 11.
Temperatur: Acetonitril 30°C, Wasser 50°C, Ofen 40°C
Flußrate: 2,0 ml/min
Säulendruck: 100 bis 120 bar
Meßwellenlänge: 220 nm, Referenzwellenlänge: 350 nm
Papiergeschwindigkeit: 1 cm/min
Signalabschwächung: 2^6
Einspritzmenge 40 µl
Analysenzeit: 11 min
Probenvorbereitung: 1 ml NM wurde mit 1,5 ml Methanol verdünnt, und zum Schutz der Trennsäule, durch ein Membranfilter 0,2 µm von Schwebstoffen befreit, und in ein Probefläschchen injiziert.

In Abbildung 3 wird eine Eichung eines ß-MDg/ß-MDt-Gemisches in NM/Methanol gezeigt (Einspritzmenge 40 µl).
Die Reihenfolge, in der Herzglycoside eluiert werden, richtet sich primär nicht nach der Anzahl der Zucker, sondern nach Zahl und Art der funktionellen Gruppen am Aglycon (TITTEL und WAGNER 1980)



1. ß-Methyldigoxin
2. ß-Methyldigitoxin

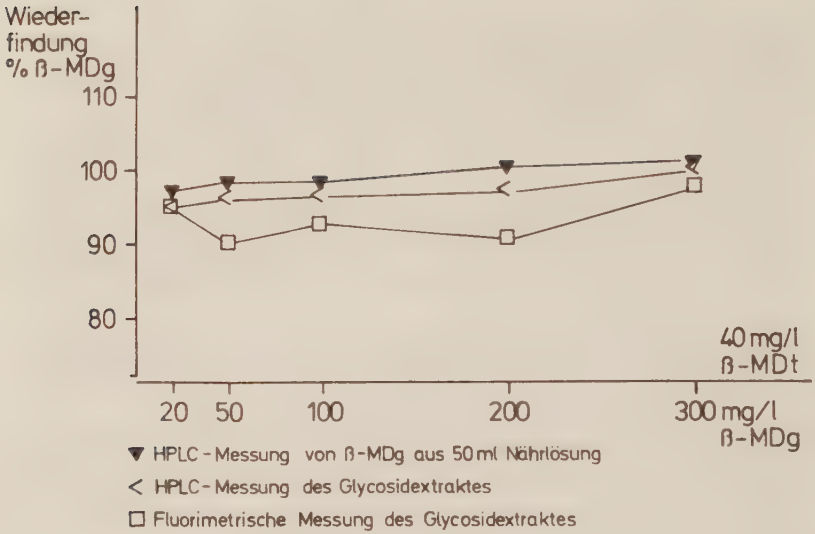
Abbildung 3: HPLC-Trennung von ß-MDg/ß-MDt

8.3.2 Fluorimetrie/HPLC-Vergleich

Eichung: Der HPLC wurde mit einer Mischung aus ß-MDg und ß-MDt, in verschiedenen Konzentrationen, von 50 mg/l bis 300 mg/l in Nährlösung/Methanol gelöst, geeicht.
Von jeder Probe wurde 40 µl eingespritzt und 5mal gemessen. Die Meßwerte lagen alle im linearen Bereich.
Vergleich: Von jeweils 50 ml MS-Nährlösung, in der 20/50/100/200 und 300 mg/l ß-MDg und 40 mg ß-MDt in Methanol gelöst, zugegeben worden war, wurde eine Probe direkt in den HPLC eingespritzt.
Die gleichen Ansätze wurden parallel dazu mit Chloroform/Methanol ausgeschüttelt, und soweit eingeengt und verdünnt, wie es auch auf die DC-Platten aufgetragen wird.
Ein Aliquot des Extraktes wurde ebenfalls in den HPLC eingespritzt, um zu sehen, wieviel Herzglycoside schon vor der fluorimetrischen Auswertung, nur durch das Ausschütteln verloren gehen.
Der konzentrierte Extrakt wurde in einem weiteren Arbeitsgang auf DC-Platten aufgetragen, die nach der Entwicklung fluorimetrisch ausgewertet wurden.
Alle drei Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Vergleich: Direkte HPLC-Messung von ß-MDg/ß-MDt aus dem Nährmedium - HPLC-Messung des Glycosidextraktes - Fluorimetrische Auswertung des Extraktes

Einwaage		HPLC Nährmedium		HPLC Glycosidextr.		Fluorimetrie Glycosidextr.	
ß-MDg	ß-MDt	ß-MDg	ß-MDt	ß-MDg	ß-MDt	ß-MDg	ß-MDt
mg/l		mg/l		mg/l		mg/l	
20	40	19,51	37,28	19,03	38,17	19,15	38,13
50	40	49,30	38,79	48,11	38,96	45,22	38,01
100	40	98,53	40,84	96,90	40,17	92,89	42,40
200	40	200,58	44,55	194,49	42,50	181,29	45,46
300	40	305,04	44,62	301,08	43,65	292,73	44,75



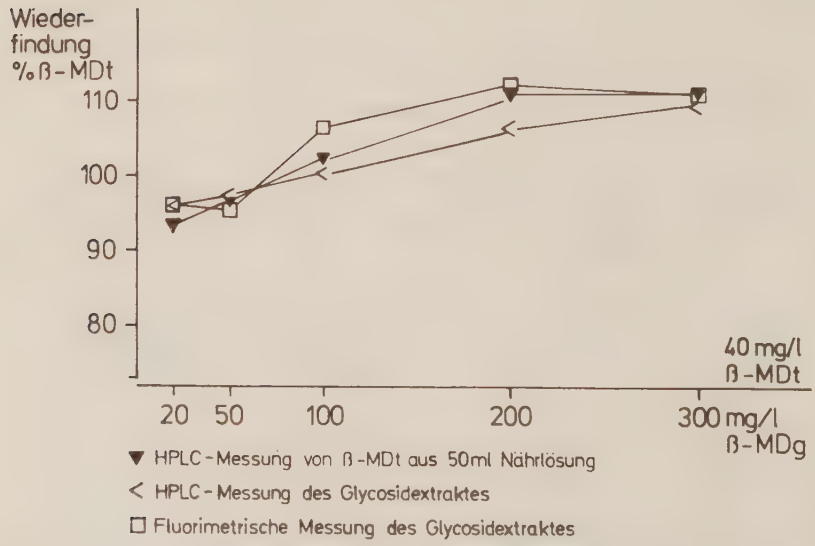


Abbildung 4/5: Wiederfindungsrate von ß-MDg/ß-MDt in der Nährlösung, im ausgeschüttelten Glycosidextrakt und nach fluorimetrischer Auswertung

Die Meßwerte aus Tabelle 1 wurden in Abbildung 4 und 5 gegen die Wiederfindungsrate aufgetragen.
Bei der fluorimetrischen Auswertung des Glycosidextraktes waren bei ß-MDg bis zu 10% weniger nachweisbar, als ursprünglich vorhanden war.
Bei ß-MDt fand man bei höheren Mengen, ab 100 mg/l im HPLC und bei der DC-Methode immer mehr, als eingewogen wurde.
Sowohl die HPLC-Messung, als auch die fluorimetrische Bestimmung der aus dem NM extrahierten Glycosidmenge, wichen lediglich um höchstens 4,8% von dem durch Direkteinspritzung des NM bestimmten Wertes ab.
Beide Abbildungen machen deutlich, daß die HPLC-Methode genauer als die DC-Auswertung ist.
Der kurzen Analysendauer von 11 Minuten beim HPLC stehen etwa 4 Stunden Arbeitszeit bei der Fluorimetrie gegenüber.
Nachdem jetzt eine so schnelle und einfache Methode erarbeitet war, war es möglich, täglich bis zu 60 Proben auszumessen.

C Ergebnisse

1. Hydroxylierung im Licht bei unterschiedlichem ß-MDt-Angebot

Bei vorangegangenen Versuchen (HELMBOLD 1979) wurde beobachtet, daß sehr hoch konzentrierte ß-MDt-Lösungen (bis zu 150 mg/l) das Wachstum und die Hydroxylierung stark beeinträchtigen.
Da sich bei geringerer ß-MDt-Konzentration von 40 mg/l das Wachstum wieder verbesserte, wurde in folgendem Versuch geklärt, inwieweit der für die Zellen relativ toxische ß-MDt-Spiegel noch weiter gesenkt werden kann.
Das Ziel dabei ist, durch eine verminderte Schädigung der Kultur zu erhöhtem Wachstum zu gelangen und dadurch eine vermehrte Hydroxylierungsaktivität zu erhalten.
Es wurden parallel zwei Fermenterversuche durchgeführt.
Je sechs Erlenmeyerkolben mit 300 ml Zellsuspension, einer 7 Tage alten Vorkultur, wurde als Inoculum verwendet.
Wie die Vorkultur erfolgte auch die Fermentation im Dauerlicht.
Ab dem 5.Tag wurden die beiden Fermenter bei einem konstanten Substratspiegel von 20 mg/l ß-MDt und 40 mg/l ß-MDt inkubiert.
Die tägliche Probenahme erfolgte bei beiden Fermentern gleichzeitig.
Beide Fermentationen wurden nach 20 Tagen abgebrochen, weil sich die Zellen dunkel verfärbten.

In Tabelle 2 sind die Daten aus beiden Fermentationen gegenübergestellt.

Tabelle 2: Übersicht über die Fermentationsdaten bei unterschiedlichem Substratangebot

	Spiegel 20 mg/l	Spiegel 40 mg/l
Fermentationsdauer	20 Tage	20 Tage
pH Verlauf	4,85 bis 5,5	4,9 bis 5,45
Animpfmenge als TG	0.60 g/l	0,78 g/l
Trockengewicht n. 20 T.	11,68 g/l	11,76 g/l
Gesamtglucoseverbrauch	42 g/l	35,3 g/l
Glucoseverbrauch pro g TG	3,59 g Glucose	3,0 g Glucose
Durchschnittl. Glucosesp. in d. Nachfütterungsphase	0,41%	0,46%
Frischzellvol. n. 20 Tag.	42,0%	40,2%
ß-MDt-Zugabemenge bis einschl. 14. Inkubat. T.	355,97 mg/l (7,12 g/20 l)	714,61 mg/l (14,29 g/20 l)
Durchschnittl. Spiegel ß-MDt/Tag in d. Nährlös.	20,3 mg/l	39,18 mg/l
ß-MDg nach 14 Inkubat. T. in Nährlösung und Gewebe	281,81 mg/l (5,64 g/20 l)	560,46 mg/l (11,2 g/20 l)
Gesamtwiederfindung an ß-MDt, ß-MDg, PA, Des-C	344,58 mg/l (6,89 g/20 l)	681,05 mg/l (13,63 g/20 l)
Wiederfindungsrate	96,8%	95,3%

Das Trockengewicht und das Frischzellvolumen zeigen bei beiden Fermentationsverläufen keinen Unterschied.
Der Glucoseverbrauch ist bei der Fermentation mit halbem ß-MDt-Spiegel etwas erhöht.
Von den insgesamt eingesetzten 7,12 g ß-MDt (20 mg/l Spiegel) wurden 6,89 g im Fermenter wiedergefunden, was einer Wiederfindungsrate von 96,8% entspricht.
Beim Fermenter mit doppeltem Spiegel lag die Wiederfindungs-

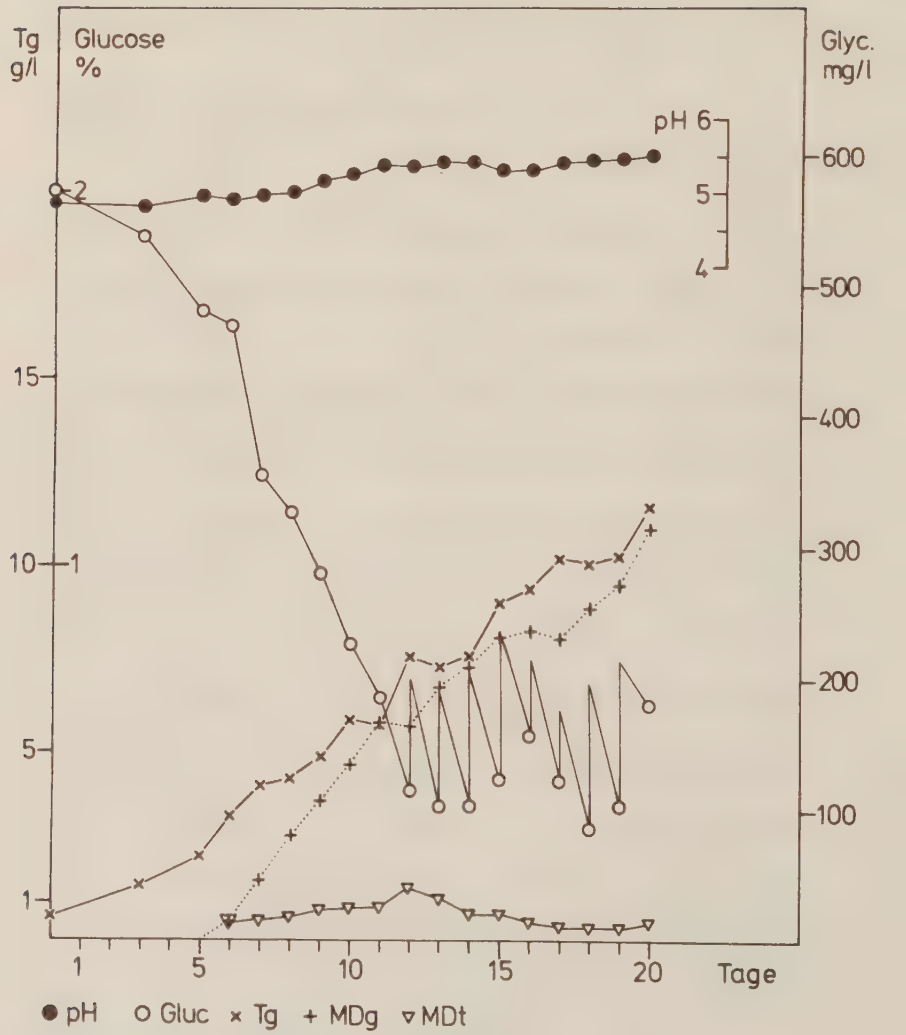


Abbildung 6: Fermentation mit Lichtstamm 287 T bei halbem ß-Methyldigitoxinspiegel 20 mg/l, 24°C, 350 NL Luft/h

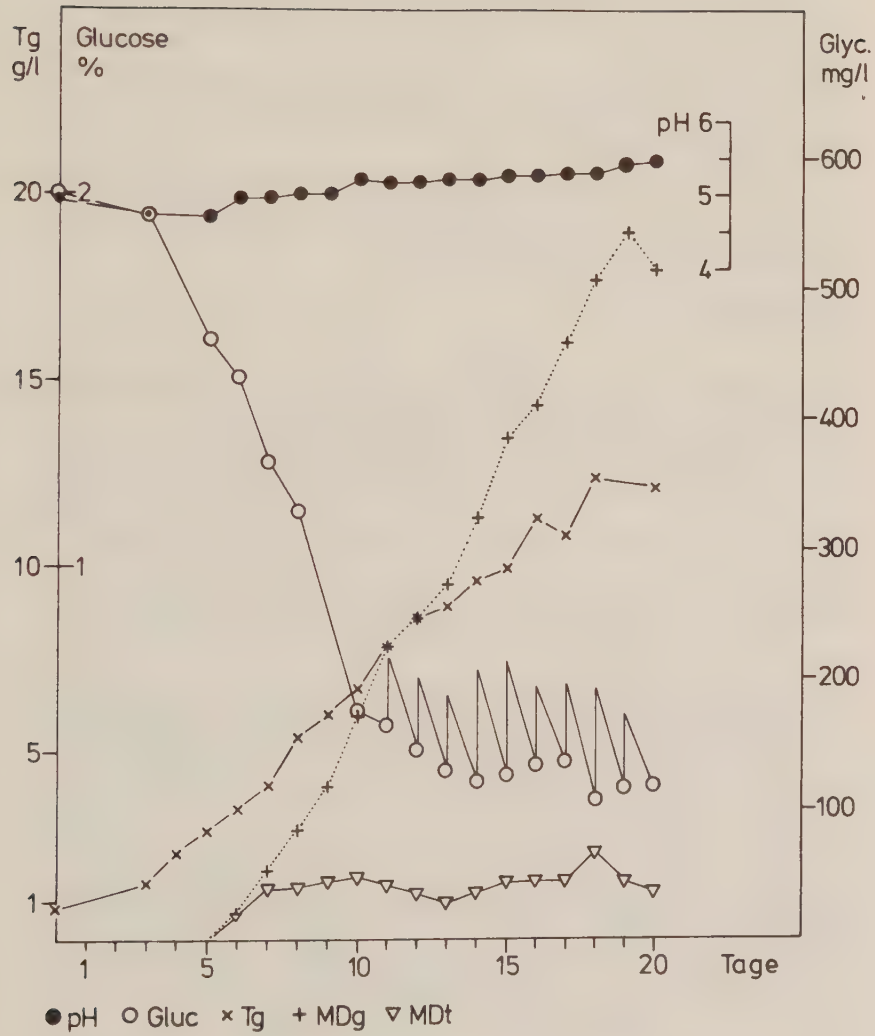


Abbildung 7: Fermentation mit Lichtstamm 287 T
ß-Methyldigitoxinspiegel 40 mg/l, 24°C

rate mit 95,3% kaum niedriger.

Aus der Abbildung 7 (40 mg/l) sieht man schon nach 18 Tagen ein Absinken des Trockengewichts, während in Abbildung 6 nach 20 Tagen noch kein Rückgang des Trockengewichtes zu erkennen ist.

Die ß-MDg-Produktion ist beim Spiegel mit 40 mg/l ß-MDt um das Doppelte höher, als bei der Fermentation mit der Hälfte des Einsatzes an ß-MDt.

Die Gesamtwiederfindung inklusive der Nebenglycoside, Purpureaglycosid A und Desacetyl-Lanatosid C, entspricht ebenfalls der jeweiligen ß-MDt-Zugabe.

Diskussion

Aus Tabelle 2 ist klar ersichtlich, daß sich die halbe ß-MDt-Dosage nicht fördernd auf das Wachstum auswirkte.

Das Trockengewicht lag bei beiden Fermentern auf gleicher Höhe, obwohl beim Spiegel mit 40 mg/l ß-MDt (gelöst in 3,25 ml Methanol 80%) sich die Toxizität der doppelten Menge nicht höher auswirkt, als bei der halben Zusatzmenge.

Bei einer verminderten Dosierung und einer damit vermuteten geringeren Beeinträchtigung zeigten die Digitaliszellen kein erhöhtes Wachstum.

Die Hydroxylierungsausbeute verhält sich genau entsprechend der eingesetzten ß-MDt-Menge: Bei doppeltem Substratspiegel erhält man auch die doppelte Menge an ß-Methyldigoxin.

So läßt sich aus diesem Versuch schließen, daß auch ein täglicher ß-MDt-Spiegel von 40 mg/l, gegenüber nur 20 mg/l, von den Zellen toleriert wird, ohne daß sich eine Zellschädigung und eine davon abgeleitete geringere Hydroxylierungsrate ergibt.

2. Wachstumsfermenter mit im Dunkeln gehaltenen Vorkulturen

Gewöhnlich wachsen Pflanzenzellen im Licht von unterschiedlicher Tages- und Wellenlänge.
Der Effekt von Licht und Dunkel auf die Biotransformation von Steroiden ist noch nicht systematisch untersucht worden.
Aus finanziellen Gründen ist eine Beleuchtung bei der Fermetation im Großmaßstab ohnehin nicht möglich.
Daher sind folgende Fragen zu beantworten:

- Inwieweit ist die 12-ß-Hydroxylierung vom Licht abhängig?
- Verändert sich eine Zellsuspension im Aussehen, in der Aggregatgröße, im Wachstum und der Hydroxylierungsfähigkeit bei längerer Kultur im Dunkeln?

Im folgenden werden zwei Wachstumsfermenter mit Digitaliszellen verglichen, deren Vorkulturen 16 und 25 Wochen lang im Dunkeln gehalten worden waren. Der Airliftfermenter aus Glas wurde ebenfalls mit einer schwarzen Papphülle verdunkelt.
In Tabelle 3 sind die Daten aus beiden Fermentationen aufgelistet.
Die erhöhte Trockengewichtsmenge der 25 Wochen alten Kultur, läßt sich auf die größere Animpfdichte zu Beginn zurückführen.
Das höhere TG erklärt auch den erhöhten Glucoseverbrauch.
Der durchschnittliche Glucoseverbrauch pro Gramm Trockengewicht ist mit 2,86 g und 2,95 g in beiden Versuchen fast identisch.
Die Abbildungen 8 und 9 zeigen die sehr ähnlichen Fermentationsverläufe.
Bei der 16 Wochen alten Kultur war das Medium nach 24 Tagen offensichtlich erschöpft. Die Zellen begannen ihre Farbe von hellgelb über hellbraun nach dunkelbraun zu wechseln, und 2 Tage später sank auch das Frischzellvolumen von 57,0% auf 55,7%.
Eine Änderung des PCV und der Farbe der Zellen zeigen immer am schnellsten eine Veränderung eines Fermentationsansatzes an.

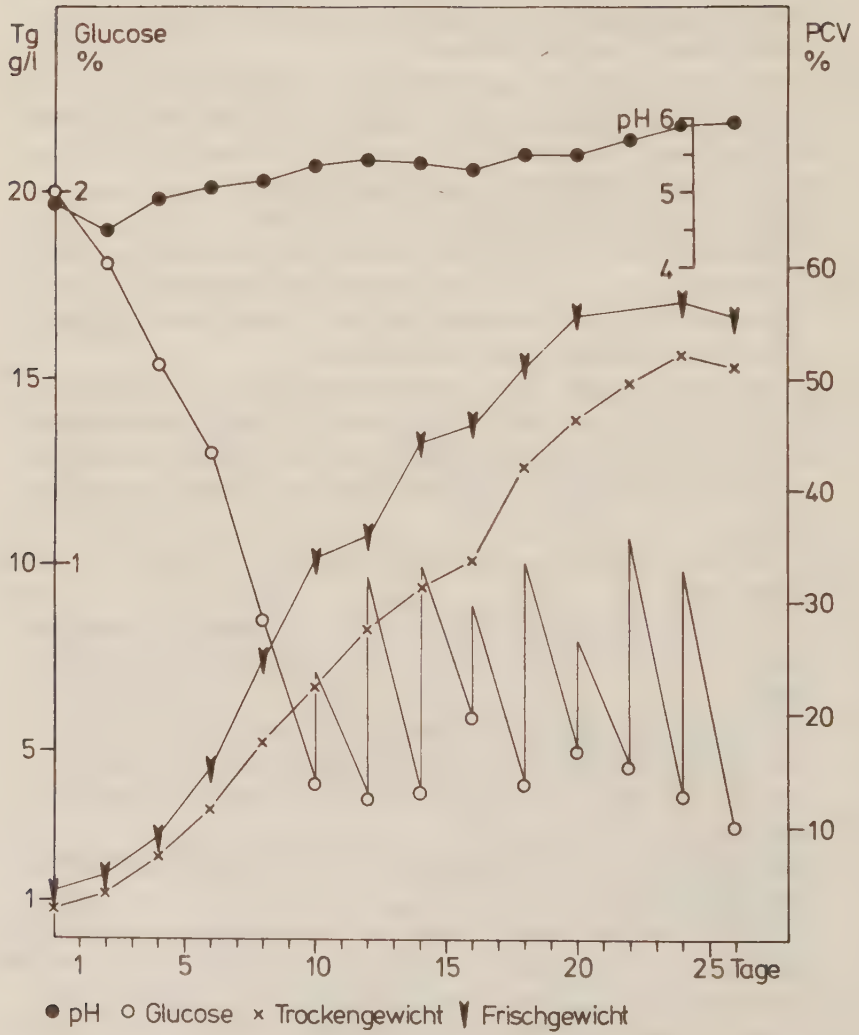


Abbildung 8: Wachstumsverlauf einer Dunkelkultur von Digitalis lanata Stamm 287T - D, nach 16 Wochen Vorkultur im Dunkeln, 24°C, 350 NL Luft/h

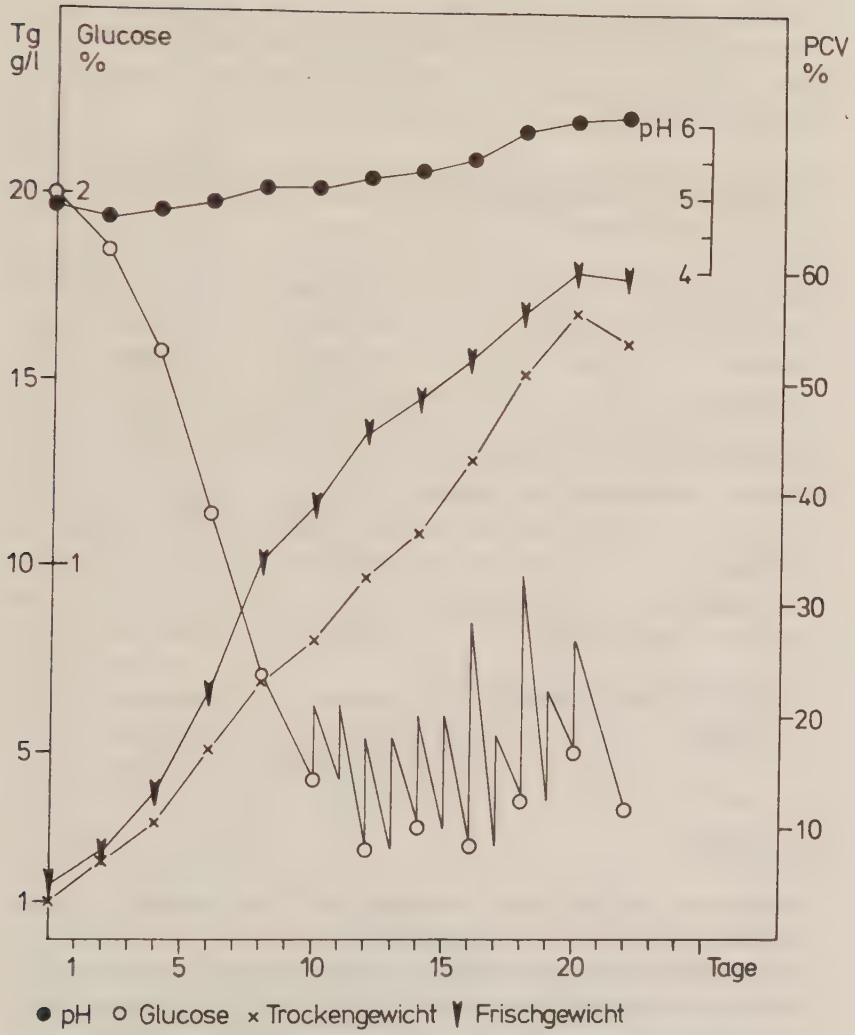


Abbildung 9: Wachstumsverlauf einer Dunkelkultur von Stamm 287 T - D, nach 25 Wochen Vorzucht im Dunkeln

Auch der stetige pH-Anstieg, während der Fermentation, könnte als Effekt einer fortschreitenden Veränderung der Mediumszusammensetzung zu sehen sein.
Das PCV und das Trockengewicht hatten bei der 25 Wochen alten Vorkultur schon nach 20 Tagen im Fermenter ihren Höhepunkt erreicht.

Tabelle 3: Fermentationsdaten der 16 und 25 Wochen alten im Dunkeln gehaltenen Vorkulturen (Endwerte in Klammern)

	16 Wochen-kultur	25 Wochen-kultur
Fermentationsdauer	26 Tage	22 Tage
pH-Verlauf	4,93 bis 5,95	4,85 bis 6,1
Animpfmenge als Trockengew.	0,79 g/l	1,06 g/l
Trockengewicht nach 20 Tagen	13,94 g/l (15,26 g/l)	16,91 g/l (16,10 g/l)
Glucoseverbrauch in 20 Tagen	39,9 g/l	49,7 g/l
Durchschnittl. Gluc.verbrauch pro g Trockengewicht	2,86 g	2,95 g
Durchschnittl. Glucosespiegel in der Nachfütterungsphase	0,45%	0,35%
Frischzellvolumen nach 20 Tag.	55,56% (55,78%)	60,08% (59,6%)

Diskussion

Vorangehend wurden zwei Fermenter mit unterschiedlich langer Vorkultur im Dunkeln vorgestellt.
Die kräftig hellgrüne Farbe der Lichtkultur, die als Ausgangsstamm diente, wurde im Dunkeln hellgelb (Verlust des Chlorophylls) und bildete gut umimpfbare Zellaggregate.
Das Aussehen der Dunkelkultur veränderte sich auch nach einer Kultivierungszeit von 25 Wochen im Dunkeln nicht mehr.
Die Zellen wuchsen mit fortschreitender Kultivierung im Dunkeln schneller. So ergaben 6 Erlenmeyerkolben der 16-wöchi-

gen Kultur 0,79 g/l Animpfgewicht im Fermenter, während es bei der 25-wöchigen Kultur schon 1,06 g/l waren.

3. Fermentation im Dunkeln mit ß-Methyldigitoxin

Nach den beiden Wachstumsfermentern im Dunkeln, wurde als nächster Schritt die Hydroxylierungs-Fähigkeit des gleichen Stammes getestet.
Als Inoculum wurden wieder 6 Erlenmeyerkolben verwendet, die aber mit 29 g Frischgewicht, statt wie zuvor mit 30 g angeimpft worden waren. Die geringere Impfdichte war notwendig geworden, da das Wachstum im Dunkeln sich beschleunigt zeigte (s.o.), die Passagendauer von 7 Tagen aus praktischen Erwägungen jedoch eingehalten werden sollte.
Am 5. Tag, bei einem Frischgewicht von 13,2%, wurden in kleinen Dosen insgesamt 70 mg/l ß-MDt, in Methanol 80%, zugegeben. Jeden weiteren Tag wurde soviel ß-MDt in den Fermenter gepumpt, daß ein Spiegel von etwa 40 mg/l gehalten wurde.
In Abbildung 10 sieht man den Fermentationsverlauf, wie er sich auf Grund der Untersuchung des Nährmediums darstellte, während in Abbildung 11 parallel zur ß-MDt-Wiederfindung, die Mengen an Nebenglycosiden in der Gewebefraktion aufgezeigt werden.
Insgesamt wurden im Fermenter 30,13 mg/l PA, als höchster Nebenglycosidanteil, gefunden, davon 10,01 mg/l im Nährmedium und 20,12 mg/l im Gewebe.
Es folgt Desacetyl-Lanatosid C mit 6,27 mg/l in dem NM und 15,57 mg/l im Gewebe.
Den geringsten Anteil hat Lanatosid A mit 4,73 mg/l im Gewebe.
Aus ∝-MDt, das als Verunreinigung in dem zugesetzten ß-MDt enthalten war, hatten sich am Ende der Fermentation insgesamt 30 mg/l ∝-MPA gebildet, dessen Hauptfraktion mit 18,13 mg/l im Gewebe gefunden wurde.
Die Gewebefraktion enthält nur etwa 5% der insgesamt wiedergefundenen Herzglycoside, sie kann daher bei der Aufarbeitung der Fermenterinhalte vernachlässigt werden.

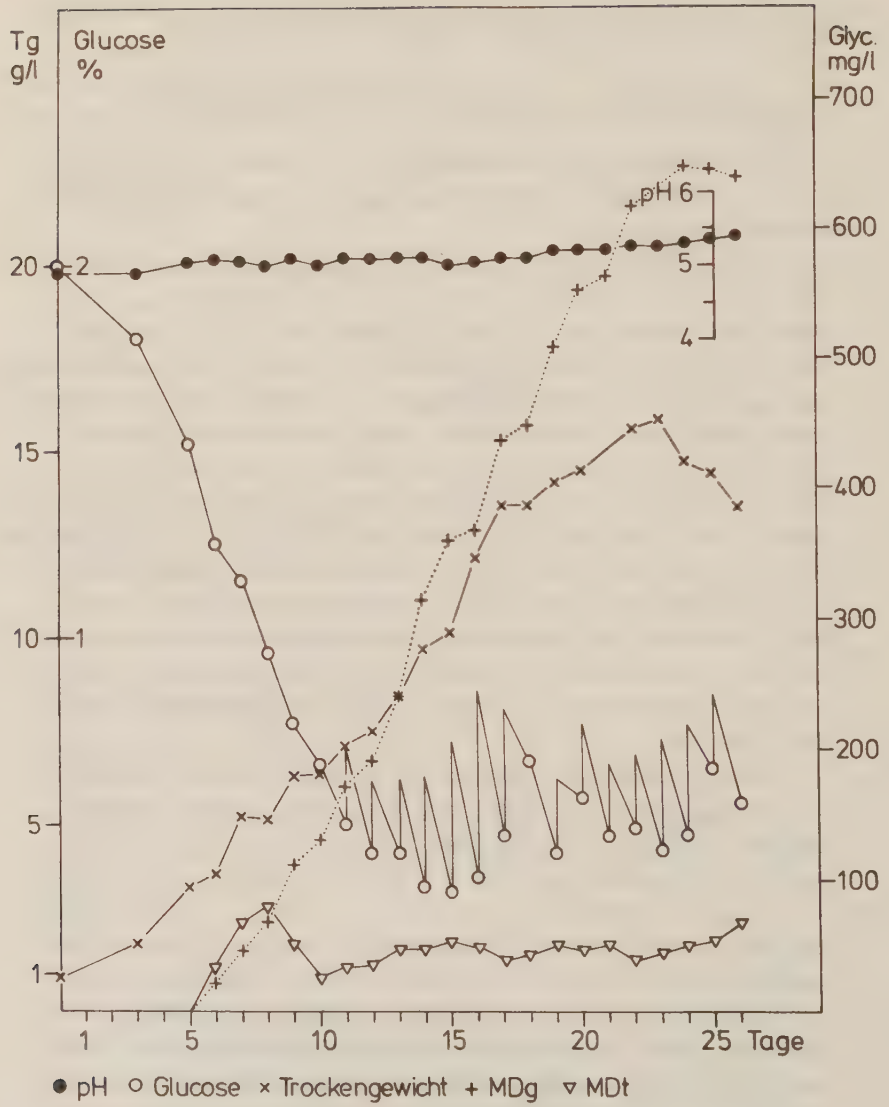


Abbildung 10: Fermentation mit ß-Methyldigitoxininkubation (44 mg/l) beim Dunkelstamm 287 T - D, 24°C, 350 NL Luft/h

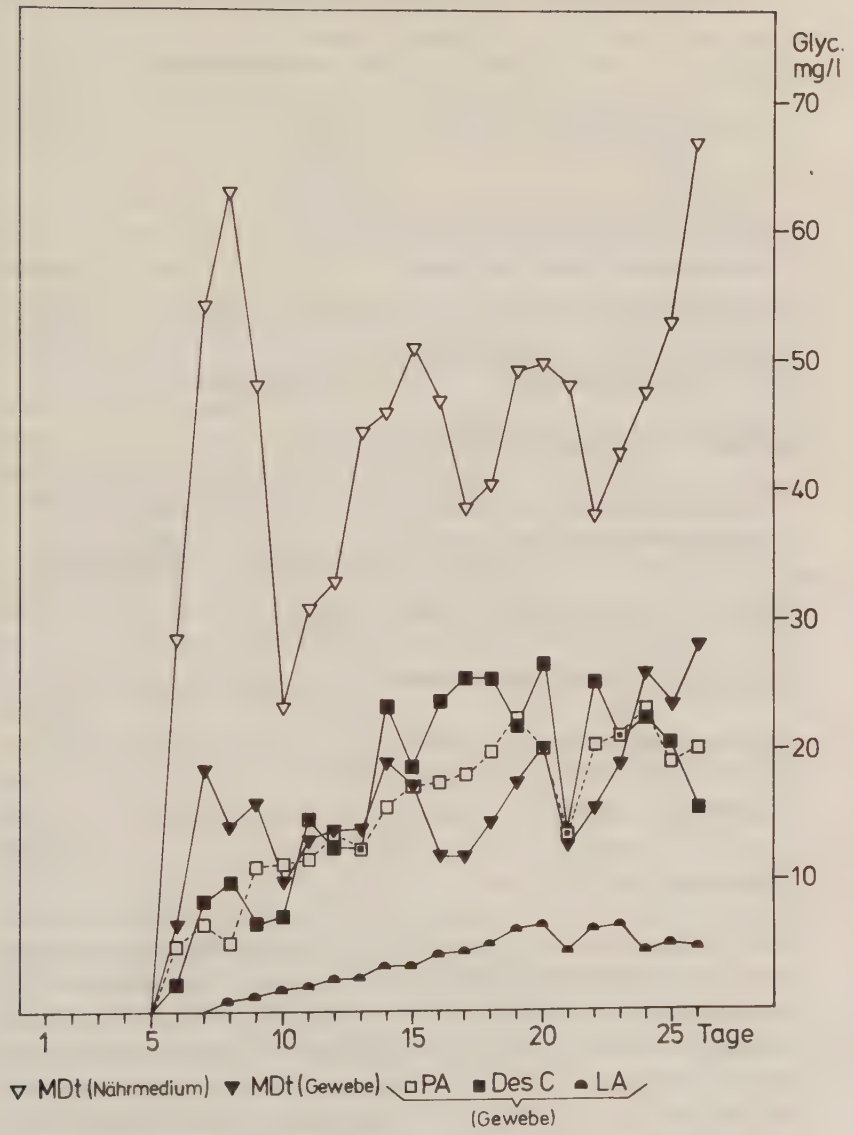


Abbildung 11: Nebenglycosidspiegel in der Gewebefraktion von Dunkelstamm 287 T - D, während kontinuierlicher ß-Methyldigitoxininkubation (44 mg/l)

Aus Tabelle 4 sind die Fermentationsdaten zu ersehen.

Tabelle 4: Dunkelfermentation mit ß-MDt-Zugabe

Fermentationsdauer	26 Tage
pH-Verlauf	4,9 bis 5,35
Animpfmenge als Trockengewicht	0,88 g/l
Trockengewicht nach 20 Tagen	14,39 g/l (13,43 g/l n.26 T.)
Glucoseverbrauch in 20 Tagen	47 g/l (58,4 g/l in 26 Tag.)
Durchschnittl. Glucoseverbr. pro g Trockengewicht	3,26 g Glucose
Durchschnittlicher Glucose-spiegel in d. Nachfütterung	0,45%
Frischzellvolumen nach 20 Tag.	46,3% (47,1% nach 26 Tagen)
ß-MDt-Zugabemenge bis zum 18. Inkubationstag (23. Ferm. Tag)	998,92 mg/l (19,98 g/20 l)
Durchschnittl. Spiegel ß-MDt pro Tag in der Nährlösung	44,44 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen in Nährlösung und Gewebe	658,71 mg/l (13,71 g/20 l)
Gesamtwiederfindung an ß-MDt ß-MDg, PA, α-MPA, Des-C, LA	798,15 mg/l (15,96 g/20 l)
Wiederfindungsrate	79,9%

Diskussion

Interessant ist der Vergleich mit dem Hydroxylierungsversuch im Licht bei gleichem ß-MDt-Spiegel (Kapitel 1). Während bei der Lichtkultur schon am 18. Tag das Trockengewicht wieder absank, stieg es bei der Dunkelkultur bis zum 23. Tag an.
Auffallend ist das höhere Trockengewicht der Dunkelkultur nach 20 Tagen mit 14,39 g/l, gegenüber 11,76 g/l bei der Lichtkultur. Daraus resultiert auch ein höherer Glucoseverbrauch der Fermentation im Dunkeln.

Dadurch, daß die Dunkelkultur schneller die log-Phase erreichte und sich auch länger lebensfähig erhalten ließ, ergab sich ein erhöhter ß-MDt-Umsatz.
Insgesamt wurden bei der Dunkelfermentation 658,71 mg/l ß-MDg produziert, bei der Lichtfermentation nur 560,46 mg/l.

In einer Vielzahl von Gewebekulturen hat sich gezeigt, daß Licht im allgemeinen die Bildung von Pflanzeninhaltsstoffen fördert.
DÖLLER et al. (1976) demonstrierten, daß die Sekundärstoffproduktion bei Catharanthus roseus abhängig vom Licht ist, was sich in einer gegenüber dem Dunkeln gesteigerten Serpentinbildung ausdrückte.
Licht von hoher Intensität steigert in Daturazellen die Alkaloidausbeute (CORDUAN 1975).
Auf der anderen Seite kann die Bildung von Sekundärstoffen im Licht gehemmt sein, zum Beispiel wird von TABATA et al. (1974) berichtet, daß die Shikoninproduktion in Lithospermumzellkulturen durch weißes und blaues Licht gehemmt wird.
NAGEL und REINHARD (1975) fanden eine unterschiedliche Terpenoidzusammensetzung bei Ruta graveolens im Licht und im Dunkeln.
Daß Biotransformationen von Steroiden auch im Dunkeln ablaufen, stellte WEBER (1978) bei Raps- und Sojakulturen fest, die mit Cholesterin gefüttert wurden.
HAGIMORI et al. (1982) untersuchten auch im Dunkel und im Licht gewachsene Digitaliskulturen. Sie stellten fest, daß photosynthetisch aktive Chloroplasten nicht essentiell für die Digitoxinproduktion sind.
Der Befund steht jedoch im Gegensatz zu PILGRIM (1972) und GARVE et al. (1980), die nachwiesen, daß Dunkelkulturen von Digitalis lanata und Digitalis purpurea keine Cardenolide, oder nur Spuren davon bildeten.

Die beiden vorangegangenen Versuche im Licht und im Dunkeln zeigen, daß für den optimalen Ablauf der 12 ß-Hydroxylierung eine Belichtung der Zellen nicht notwendig ist.

4. Selektion von Zellinien mit erhöhtem Wachstum

Das relativ langsame Wachstum pflanzlicher Zellkulturen gegenüber von Mikroorganismen, ist das Haupthindernis für eine praktische Anwendung.
In Falle der Digitaliszellen steigt die biotransformatorische Aktivität, parallel mit Zellwachstum, Zellteilungsrate und Substratverbrauch an.
Eine gute Möglichkeit, schnell wachsende Zellinien zu erhalten wäre es, die Mediumszusammensetzung zu verändern, und sie in Bezug zu den vorhergehenden Licht/Dunkelversuche zu setzen.
Als Ausgangsstamm wurde der Lichtstamm 287 T und der Dunkelstamm 287 T - D verwendet.
In Tabelle 5 sind die Versuchsmedien und ihre im Text verwendeten Abkürzungen wiedergegeben.

Tabelle 5: Mediumsvariationen des Langzeitversuches

D	Dunkelstamm
T	Lichtstamm
ToC	Lichtstamm ohne Casein
DoC	Dunkelstamm ohne Casein
P	Dunkelstamm mit 340 mg/l KH_2PO_4 (anstelle von nur 170 mg/l)
PP	Dunkelstamm mit 510 mg/l KH_2PO_4 (anstelle von nur 170 mg/l)
T_{10}	Dunkelstamm mit 1 mg/l Thiamin (anstelle von nur 0,1 mg/l)
oCP	Dunkelstamm ohne Casein mit 340 mg/l KH_2PO_4

Phosphat: Um den Phosphateinfluß über einen längeren Zeitraum zu beobachten, wurden zwei verschiedene Phosphatkonzentrationen ausgewählt.
Dem Murashige und Skoog-Medium (MS) mit 170 mg/l KH_2PO_4 Ausgangsmenge wurden zusätzlich 170 mg/l und 340 mg/l Phos-

phat zugesetzt, insgesamt somit 340 mg/l und 510 mg/l KH_2PO_4 (P und PP).
Das MS-Medium mit 170 mg/l Phosphat wurde sowohl im Licht, als auch im Dunkeln mitgeführt (T und D).

Casein: Die Stickstoffbedürfnisse der Zellkultur werden im MS-Medium durch 40 mmol NO_3-N und 20 mmol NH_4-N gedeckt. Zusätzlich wird noch Caseinhydrolysat zugegeben.
Casein als tierisches Produkt ist nicht in gleichbleibender Zusammensetzung erhältlich. Die Aminosäurenzusammensetzung und der pH-Wert der einzelnen Charge variiert stark (NOLAN und NOLAN 1972), und dies kann somit die Versuchsergebnisse beeinflussen. Daher wurde in den vorliegenden Versuchen immer darauf geachtet, die gleiche Caseincharge zu verwenden. Es wäre aber, wegen obigen Unwägbarkeiten von Vorteil, wenn man das Caseinhydrolysat ganz aus dem Medium weglassen könnte. Außerdem würde dies die Fermentationskosten senken. Auch wäre es möglich, daß die Suspensionskulturen gar nicht alle Aminosäuren aus dem Casein benötigen, sondern eventuell diejenigen, die nicht verbraucht werden, sogar das Wachstum hemmen.
Es wurden Licht- sowie Dunkelkulturen in caseinfreiem Medium beobachtet (ToC und DoC).
Im Verlauf des Versuches zeigte sich, daß die Phosphatmedien besser als die anderen Medien waren. Daher wurde ab der 15. Woche in dem oCP-Medium fortgesetzt (oCP).

Thiamin: Schon GAMBORG et al. (1968) und OHIRA et al. (1976) stellten fest daß Thiamin als essentielle Komponente für manche Zellkulturen benötigt wird.
Im Medium nach WHITE (1943) liegt Thiamin in einer Konzentration von 0,1 mg/l vor, während im Medium nach HELLER (1953) 1 mg/l, und bei GAMBORG et al. (1968) sogar 10 mg/l Thiamin dem Medium zugesetzt werden.
Um zu sehen, welche Thiaminkonzentration für die Digitalisdunkelkulturen günstiger ist, wurde zusätzlich noch ein Ansatz mit 1 mg/l Thiamin mitgeführt (T_{10}).

Umimpfmethode: In diesem 28 Wochen dauernden Versuch, wurde jede Woche am gleichen Tag und möglichst zur gleichen Stunde, 300 ml Zellsuspension aus 1 l Schüttelkolben, unter sterilen Bedingungen durch ein Nylonnetz (Maschenweite 100 um) abfiltriert.
Ein Teil der Zellmasse wurde in frisches Medium eingewogen. Bei jeweils zwei Schüttelkolben des gleichen Mediums und der gleichen Passage, wurde das Absetzvolumen (PCV) in einem 100 ml Meßzylinder, der pH, und die Restglucose gemessen. Entsprechend der Restglucose, die sich auf Grund der Anpassung der Zellen an das Medium kontinuierlich veränderte, wurde die Zelleinwaage für das frische Medium festgelegt.
Für alle Medien wurde ein konstanter Restglucosegehalt angestrebt, um die Zellen bezüglich der Kohlehydratversorgung nicht in einen "Mangelzustand" zu bringen.
Bei den Medien mit 340 mg/l und 510 mg/l Phosphat wurde so die Umimpfmenge von anfangs 30 g auf 23 g gesenkt.
Der Dunkel- und Thiaminstamm lagen am Ende des Versuches bei 28 g und die caseinfreien Dunkelstämme bei 26 g Einwaage, Die Lichtstämme konnten kontinuierlich bei 30 g gehalten werden.
In Abbildung 12 sind die wöchentlich erhaltenen PCV-Werte auf einheitlich 30 g Umimpfmenge hochgerechnet worden.
In Tabelle 6 werden die End-PCV-Werte der 28. Passage in Prozent angegeben. Darunter steht das Trockengewicht in g/l.

Tabelle 6: Frischgewicht und Trockengewicht nach 28 Passagen auf unterschiedlichen Medien

	P	PP	oCP	DoC	T_{10}	ToC	D	T
PCV:	52,5	52,3	43,4	40,9	39,6	39,4	38,2	35,1
TG:	0,93	0,89	0,81	0,82	o,70	0,81	0,80	0,79

Ergebnisse und Diskussion

Auf längere Sicht hin werden bessere Wachstumsergebnisse im Dunkeln erreicht, sowohl bei den caseinfreien, als auch bei den caseinhaltigen Medien.

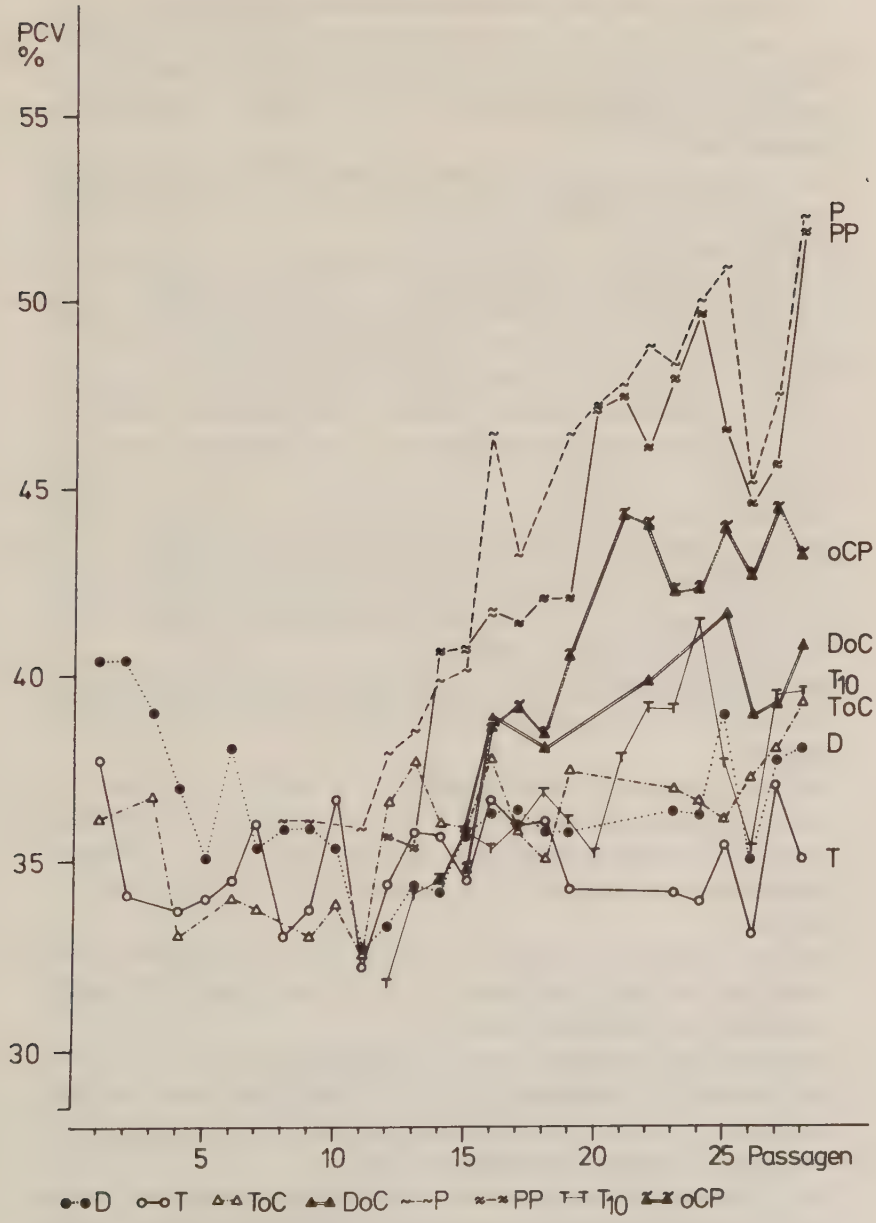


Abbildung 12: Sinkvolumen (PCV) von Digitalis lanata-Zellen in unterschiedlichen Medien im Langzeitversuch über 28 Passagen

Im Dunkeln ist der Zellstoffwechsel unabhängig von der Bereitstellung, der für die Photosynthese im Licht notwendigen Bausteine. Der somit anders ablaufende Stoffwechsel könnte eine mögliche Erklärung für das bessere Wachstum im Dunkeln sein.
Die größte Wachstumssteigerung zeigte sich bei der Zugabe von 340 mg/l Phosphat. 510 mg/l brachten keine weitere Wachstumsteigerung.
Es gibt widersprüchliche Angaben dafür, ob Phosphat über 1,5 mmol im Medium das Wachstum in Zellkulturen hemmt oder nicht. MURASHIGE und SKOOG (1962) hatten gefunden, daß Phosphat über 1,5 mmol das Wachstum unterdrückt.
Einen wachstumssteigernden Effekt unter erhöhtem Posphatzusatz hatte 1965 schon ERIKSSON bei Haplopappus gracilis beobachtet.
Auch KATO et al. (1972) und NOGUCHI (1977) hatten bei Tabakzellen demonstriert, daß der Anstieg des Wachstums fast ausschließlich auf den Phosphatzusatz zurückzuführen war.
Für jede Zellkultur muß deshalb ein optimaler Phosphatlevel selbst herausgefunden werden.
Das Vergleichsmedium mit nur 170 mg/l Phosphat erbrachte ein um 28% niedrigeres End-Frischgewicht, als die Phosphatmedien.
Der Vergleich der Trockengewichte der Medien mit Casein (D und T) und ohne Casein (ToC und DoC) zeigten bei 170 mg/l Phosphat keinen Unterschied, aber bei Medien mit erhöhtem Phosphatgehalt steigert Casein zusätzlich das Wachstum (P und PP).
Bei dem Lichtstamm ohne Casein (ToC) war eine kräftig grüne Farbe auffallend, die Zellen im Licht mit Casein (T) waren bedeutend chlorophyllärmer.
BERGMANN und BERGMANN (1968) hatten festgestellt, daß nur belichtetes Zellmaterial Thiamin bilden kann, weil im Dunkeln das Wachstum bei Nicotiana-Zellkulturen proportional dem exogen zugeführtem Thiamin ist.
Die Erhöhung des Thiamins auf die 10fache Menge des MS-Ausgangsmediums führte bei den Digitaliszellen nicht zu einer

Wachstumssteigerung.
Licht ist wahrscheinlich ein Faktor, der die Thiaminsynthese fördert. Das könnte als Hinweis auf eine Beteiligung der Photosynthese am Stoffwechsel dieses Vitamins im grünen Gewebe gedeutet werden.
Jedoch OJIMA und OHIRA (1978) stellten zwei Gruppen der Thiaminabhängigkeit fest. Eine Gruppe, bestehend aus Sojabohnen, Reis und Tabak benötigt Thiamin, während die andere ohne Thiamin wächst. Bei einer Rutakultur führt er allerdings die Unabhängigkeit von Thiamin auf den schon makroskopisch angedeuteten Differenzierungsgrad zurück. Jedoch konnten auch thiaminautotrophe Tabakkulturen isoliert werden.

Nachdem das beste Ergebnis mit der 2fachen Ausgangsmenge an Phosphat erzielt wurde, wurde im folgenden dieser Zusatz beibehalten, wenn es nicht anders erwähnt wird.
Trotz dieser guten Wachstumsergebnisse ist Vorsicht geboten, denn die Beschleunigung des Zellwachstums wird nicht immer mit einer Verbesserung der Hydroxylierung einhergehen, und es besteht die Gefahr, das gesteigerte Wachstum mit einer Einbuße bei der Biotransformations-Kapazität zu erkaufen.

5. Fermentation mit unterschiedlichem Phosphatgehalt mit und ohne Casein

5.1 Vorversuche im Schüttelkolben

Da sich im vorhergehenden Langzeitversuch die zusätzliche Phosphatzugabe für das Wachstum bewährt hatte, interessierte nun vor allem, zu welchem Zeitpunkt innerhalb einer Passage das Phosphat von den Zellen aufgenommen wird, und wieviel im Medium zurückbleibt.
Es war auch zu untersuchen, inwieweit die Wachstumskinetik davon abhängt.
7 Tage lang wurden täglich zum gleichen Zeitpunkt zwei Kolben des MS-Grundmediums und zwei Kolben des P-Mediums (340 mg/l KH_2PO_4) auf folgende Parameter untersucht: Glucose, Phosphatgehalt, Trockengewicht, Frischgewicht, pH und Leitfähigkeit.
In Abbildung 13 und 14 ist der genaue Verlauf während einer Passage zu verfolgen.

Der größte Unterschied war beim Phosphatverbrauch zu sehen: von der ursprünglich eingesetzten Phosphatmenge von 170 mg/l waren am dritten Tag nur noch Spuren im Medium nachzuweisen, während bei einer Ausgangskonzentration von 340 mg/l, bis zum fünften Tag Phosphat im Medium vorhanden war.
Geringer fallen folgende Werte ins Gewicht: der pH stieg bei der Kultur ohne zusätzliches Phosphat von 4,8 auf 5,1 an, während bei der Phosphatkultur, bei fast gleichem Ausgangswert von 5,0, der pH in den ersten beiden Tagen stark sank, um dann am Passagenende auf pH 4,5 anzusteigen.
Das Frisch- und Trockengewicht war, wie man aus den Vorversuchen in Kapitel 4 erwarten konnte, bei der Phosphatkultur gegenüber der Kultur auf dem Grundmedium erhöht.
Durch das verbesserte Wachstum wurde auch mehr Glucose verbraucht. Auch die Leitfähigkeit sank bei der Phosphatkultur stärker, was auf einen höheren Verbrauch von Ionen aus dem Medium schließen läßt.

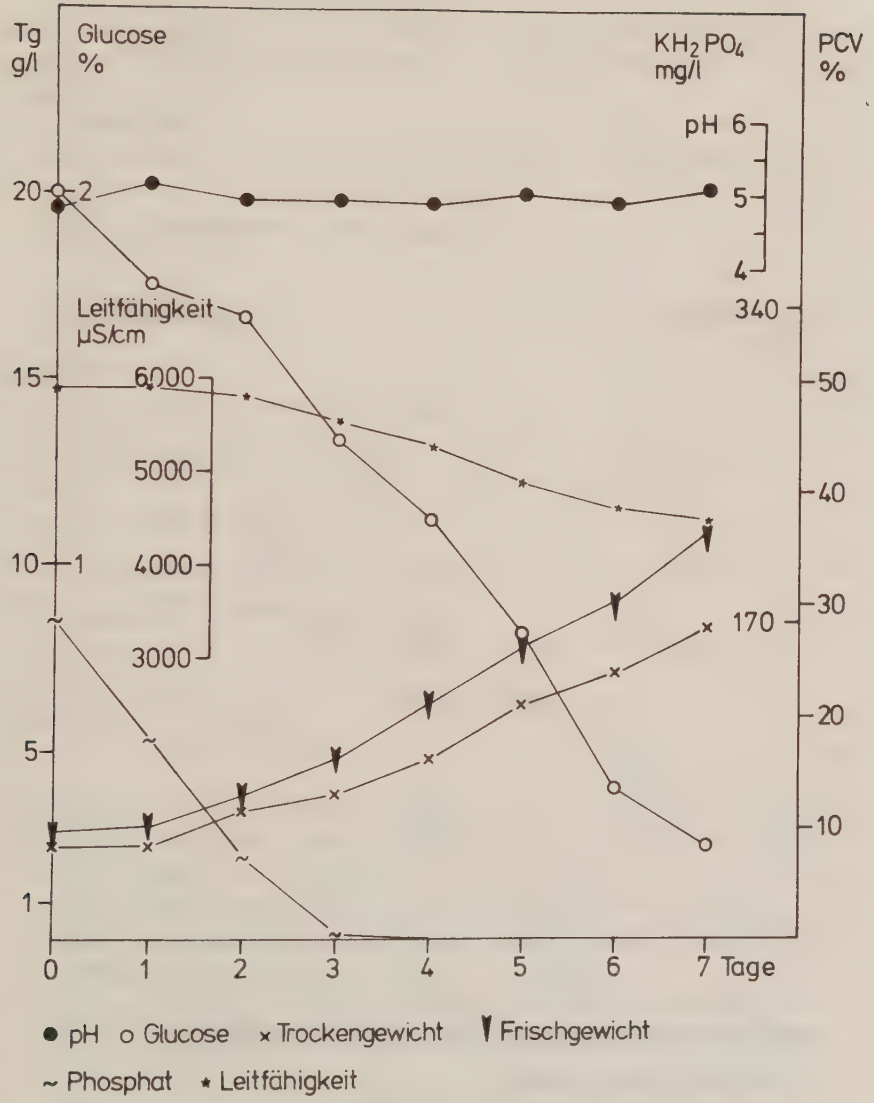


Abbildung 13: Passagenverlauf von Digitalis lanata auf MS-Medium mit 170 mg/l KH_2PO_4 im 1 l-Schüttelkolben

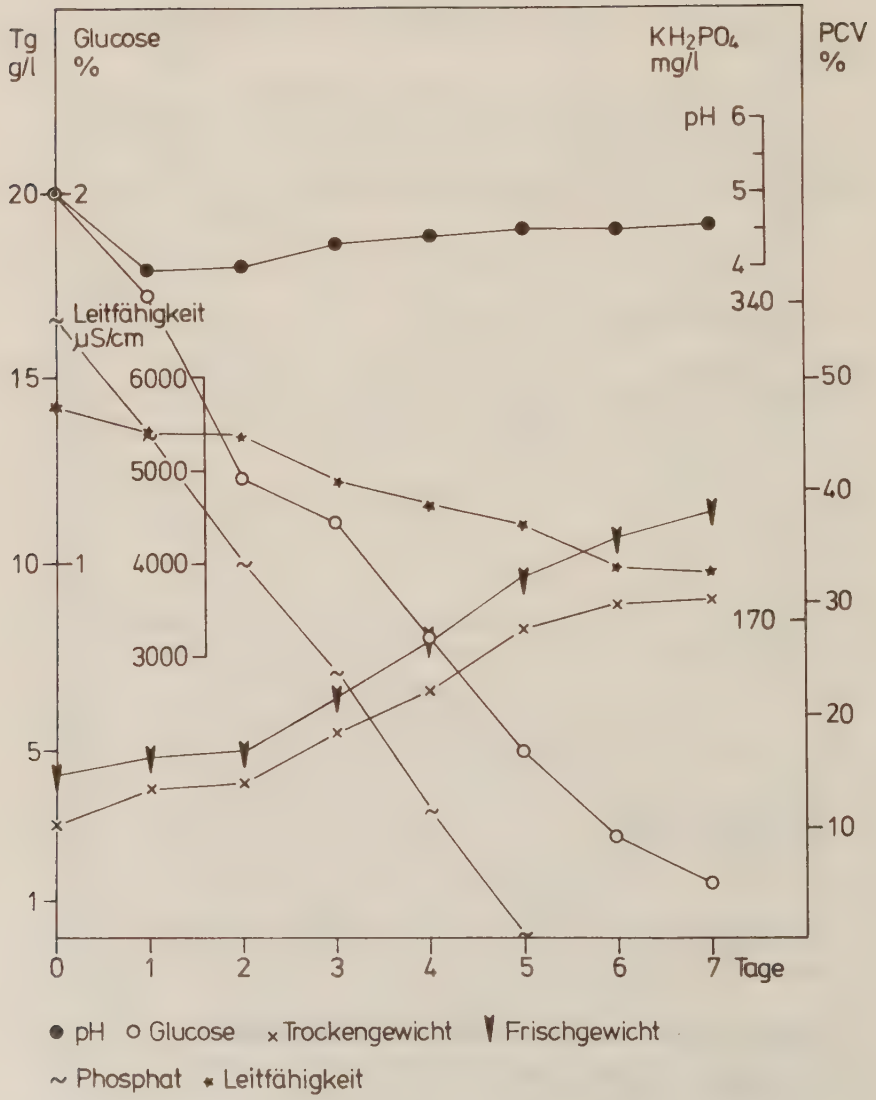


Abbildung 14: Passagenverlauf von Digitalis lanata auf MS-Medium mit 340 mg/l KH_2PO_4, 24°C, 100 Upm

5.2 Fermentation im Vollmedium mit 340 mg/l KH_2PO_4

Im Anschluß daran wurde untersucht, die Ergebnisse mit den am besten wachsenden Zellinien der Schüttelkolbenversuche aus Kapitel 4 im 20 l-Maßstab des Airliftfermenters zu reproduzieren.
In Tabelle 7 sind die Versuchsdaten aufgelistet, und aus Abbildung 15 ist der Fermentationsverlauf ersichtlich.

Tabelle 7: Übersicht des Fermentationsverlauf beim P-Fermenter

Fermentationsdauer	39 Tage
pH-Verlauf	4,73 bis 5,15
Animpfdichte als Trockengewicht	1,08 g/l
Trockengewicht nach 20 Tagen	16,91 g/l
nach 35 Tagen	23,96 g/l
Gesamtglucoseverbrauch	114,4 g/l
Glucoseverbrauch pro g Trockengewicht	4,58 g
Frischzellvolumen nach 20 Tagen	68,9%
nach 35 Tagen	92,7%

5.3 Fermentation im Vollmedium ohne Casein mit 170 mg/l KH_2PO_4

Aus den vorhergehenden Ergebnissen (Kap.4) sieht man, daß Casein nicht unabdingbar notwendig für das Wachstum zu sein scheint. Nach der Fermentation 5.2 mit Casein und doppelter Phosphatmenge wurde beim folgenden Versuch nun auf das Casein im Medium verzichtet und Phosphat wurde bei dem Gehalt der MS-Vorschrift (170 mg/l) belassen.
Zum ersten Mal wurde hier das Wachstum der untersuchten Digitaliszellen in einem Fermentermedium ohne Casein getestet.
In Tabelle 8 und in der Abbildung 16 sind die Resultate aufgezeigt.

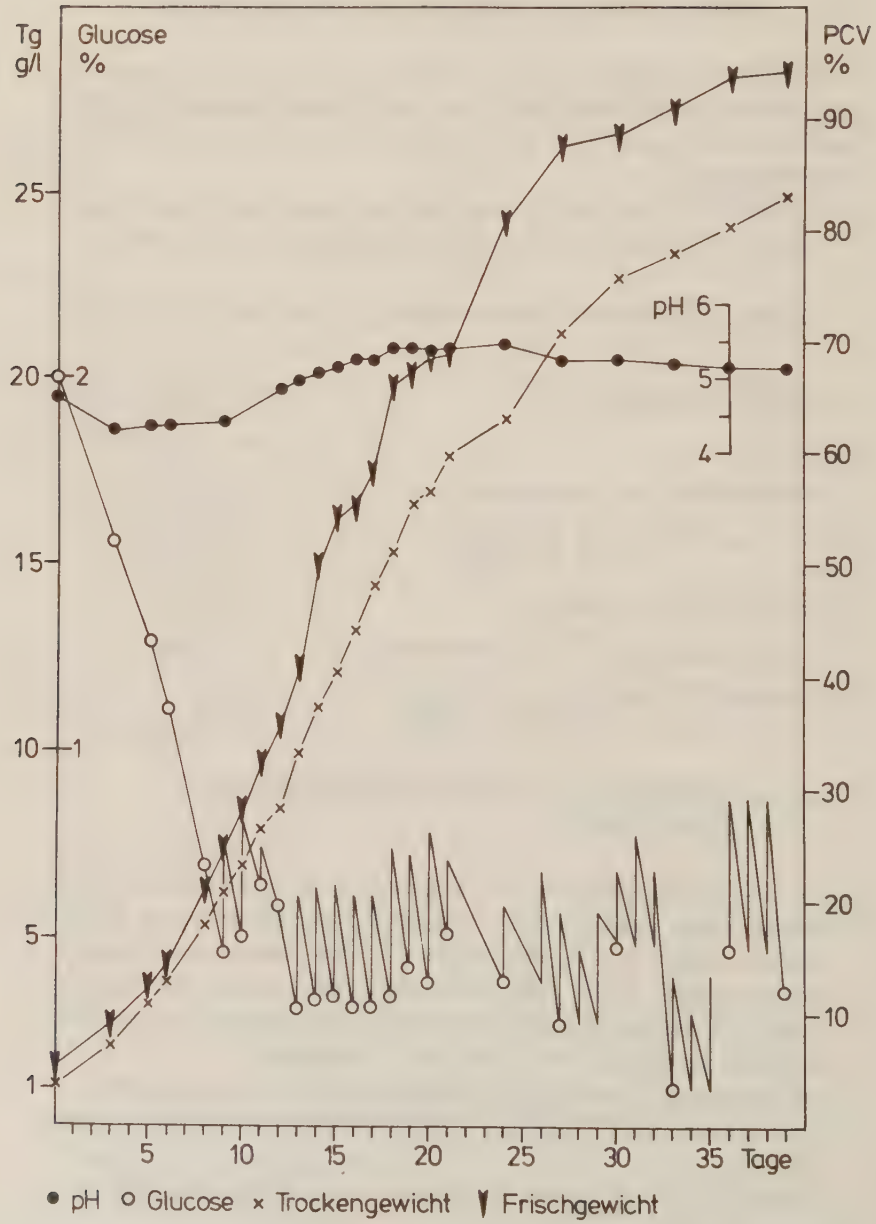


Abbildung 15: Fermentation von Digitalis lanata im Vollmedium mit 340 mg/l KH_2PO_4, 24°C, 350 NL Luft/h

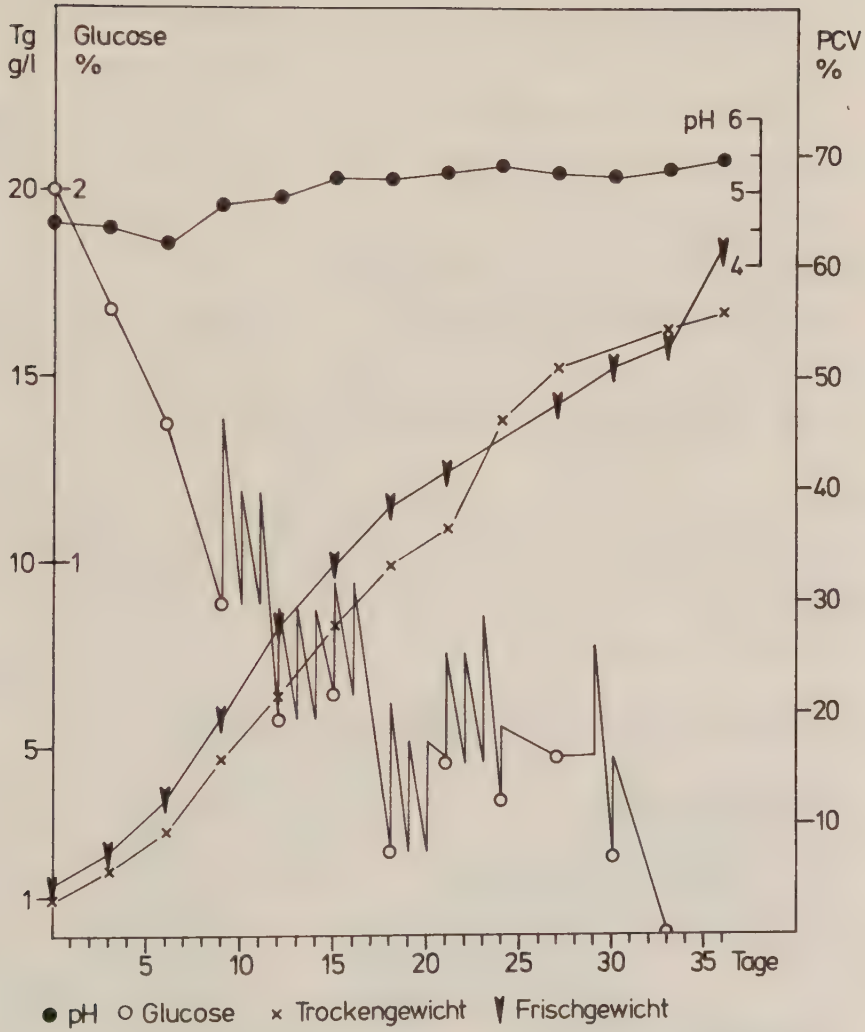


Abbildung 16: Fermentation von Digitalis lanata, Dunkelstamm 287 T - D, vorgezogen in caseinfreiem Medium

Tabelle 8: Übersicht der Daten beim Fermenter ohne Casein (oC-Fermenter)

Fermentationsdauer	36 Tage
pH-Verlauf	4,55 bis 5,46
Animpfdichte als Trockengewicht	1,01 g/l
Trockengewicht nach 20 Tagen	11,25 g/l
nach 35 Tagen	16,64 g/l
Gesamtglucoseverbrauch	67,1 g/l
Glucoseverbrauch pro g Trockengewicht	3,99 g
Frischzellvolumen nach 20 Tagen	40,5%
nach 35 Tagen	58,8%

5.4 Fermentation im Vollmedium ohne Casein mit 340 mg/l KH_2PO_4

Da im Langzeitversuch auch der Stamm ohne Casein und mit gleichzeitiger Phosphaterhöhung auf 340 mg/l gute Ergebnisse zeigte, wurde auch diese Zellinie im Fermenter getestet. Aus Tabelle 9 und aus Abbildung 17 sind die Meßwerte und Kurven zu entnehmen.

Tabelle 9: Übersicht der Fermentation ohne Casein mit erhöhter Phosphatmenge (oCP-Fermenter)

Fermentationsdauer	51 Tage
pH-Verlauf	4,4 bis 4,9
Animpfdichte als Trockengewicht	0,96 g/l
Trockengewicht nach 20 Tagen	12,46 g/l
nach 35 Tagen	18,63 g/l
nach 51 Tagen	20,84 g/l
Gesamtglucoseverbrauch	109,7 g/l
Glucoseverbrauch pro g Trockengewicht	5,31 g
Frischzellvolumen nach 20 Tagen	51,7%
nach 35 Tagen	88,8%
nach 51 Tagen	94,8%

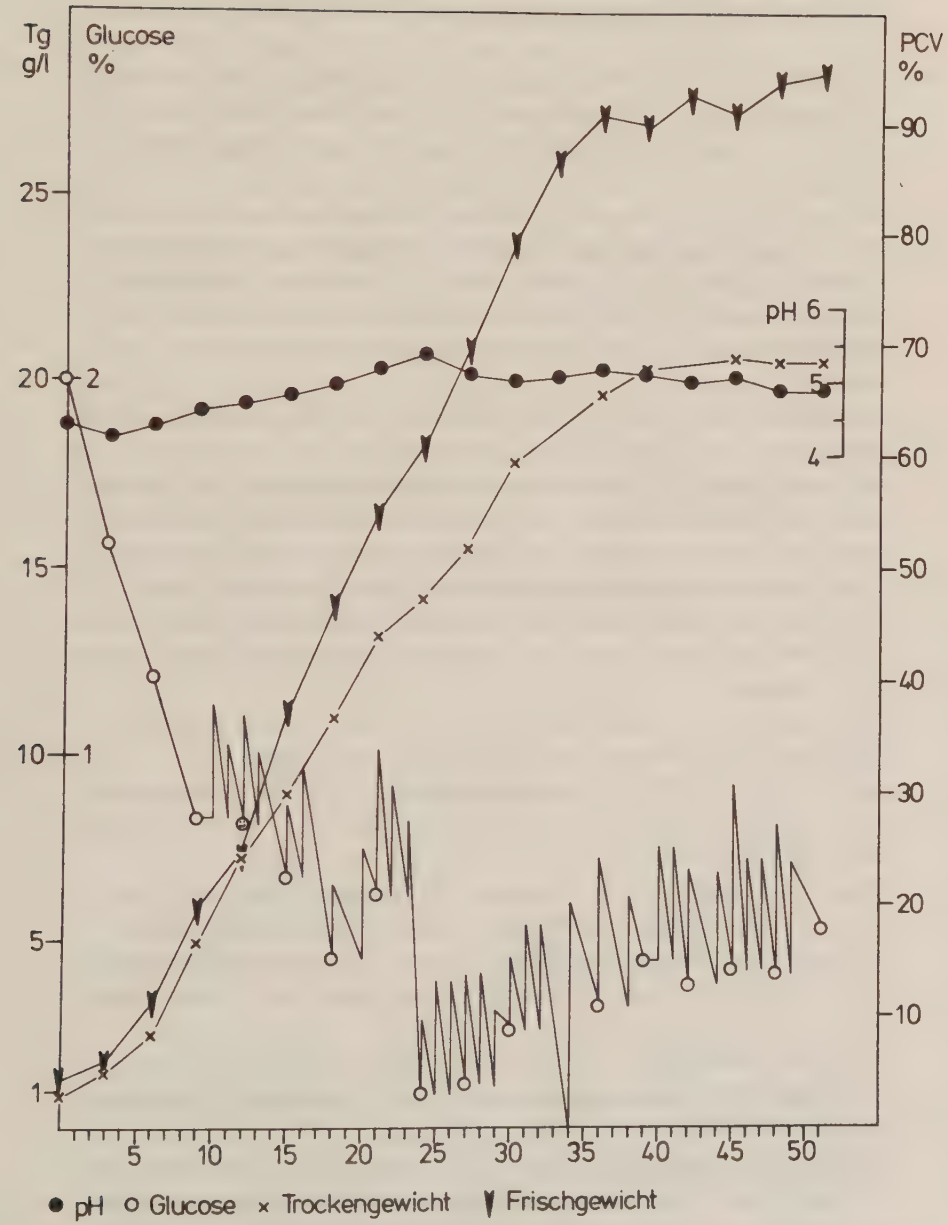


Abbildung 17: Wachstumsverlauf von Digitalis lanata im Vollmedium ohne Casein mit 340 mg/l KH_2PO_4

Diskussion der Fermentationen

Bei der Fermentationsdauer der drei Fermenter war die lange Lebensdauer von 51 Tagen, bei dem Stamm ohne Casein, auffallend, gegenüber 36 und 39 Tagen bei den beiden anderen Linien.
Es kann nicht an einem langsameren Wachstum und verzögerten Verbrauch der lebenslimitierenden Substanzen liegen. Da der Fermenter ohne Casein schon nach 20 Tagen ein geringeres Trockengewicht hatte, als der gleiche Ansatz, aber mit erhöhtem Phosphat, läßt sich direkt das Phosphat dafür verantwortlich machen.
Vergleicht man diese Trockengewichte mit dem Versuch im Vollmedium mit 340 mg/l KH_2PO_4, so liegt bei diesem Versuch das TG schon nach 20 Tagen eindeutig höher, als bei den Fermentern ohne Caseinzusatz. Mit 23,96 g/l erreichte das Trockengewicht, beim P-Fermenter, eine bis dahin nicht gemessene Höhe, ebenso ist das Frischgewicht mit 92,7% sehr hoch.
Der pH-Verlauf war normal, außer daß der pH des oCP-Fermenters während des ganzen Zeitraumes von 51 Tagen nicht über pH 5 stieg.
Der Gesamtglucoseverbrauch pro Liter war, gemäß dem hohen Wachstum des P-Fermenters, dort auch am größten.
Der erheblich höhere Glucoseverbrauch pro g Zelltrockengewicht beim oCP-Fermenter resultierte aus der längeren Laufzeit des Reaktors.
Bisher erreichten die Fermenter in ihrer Lebensdauer kaum die 30 Tage-Grenze, erst jetzt durch die Schüttelkolbenvorzucht auf dem Phosphatmedium und dem caseinfreien Medium mit erhöhtem Phosphat, konnte diese Grenze weit erhöht werden.
Bei den Fermentern mit 340 mg/l KH_2PO_4 war ca. nach 25 Tagen ein stärkeres Auseinanderdriften der PCV-Kurve mit derjenigen des Trockengewichtes zu bemerken.
Am Trockengewicht läßt sich ja der direkte Zellzuwachs ablesen, wobei das Frischzellvolumen nur die Absetzmenge der Zellen in einem bestimmten Zeitraum charakterisiert. Es läßt

außer Acht, ob sich die Zellvakuolen nur mit Wasser aufgebläht haben, oder ob die Zunahme durch Zellteilung und Vermehrung an Zellmasse entstanden ist.
Bei beiden Phosphatfermentern wurde mehr Wasser in die Zellen eingelagert, was zu einem erhöhten PCV führte.
Dies könnte dadurch bedingt sein, daß es infolge der erhöhten Phosphataufnahme in der P- und oCP-Fermentation zu einem Anstieg des Ionenpotentials in den Zellen kommt.
Das führt dann zu einem vermehrten Einstrom von Wasser in die Zellen. Phosphat liegt in der Zelle offensichtlich als freies anorganisches Phosphat vor, weil gegen Ende der Fermentation, infolge Lyse der Zellen, wieder Phosphat im Medium nachweisbar ist.
Zu Beginn der Fermentation führte aber erhöhtes Phosphatangebot zu einer vermehrten Zellteilung und daraus folgend zu einem erhöhten Trockengewicht am Ende der Fermentation.
Das zeigt, daß zwar die Fermentation ohne Casein gut möglich ist, aber doch nicht den Zuwachs an Biomasse erbringt, wie er bei den Fermenterversuchen auf Vollmedium mit erhöhtem Phosphat erzielt wurde.

6. Hydroxylierung im caseinfreien Vollmedium durch Dunkelkulturen

Während 17 Wochen weiterer Vorzucht auf MS-Medium ohne Caseinzusatz, zeigte sich schon bei der Vermehrung im Erlenmeyerkolben eine zunehmende Vergröberung der Zellaggregate und ein geringeres Wachstum.
Nach den Wachstumsfermentern ohne Casein (oC- und oCP-Fermenter), sollte nun überprüft werden, inwieweit der Entzug des Caseinhydrolysates sich auf die Hydroxylierung auswirkt. Tabelle 10 zeigt die Fermentationsdaten.

Tabelle 10: Übersicht über die Fermentation ohne Casein mit ß-MDt-Zusatz

Fermentationsdauer	20 Tage
pH-Verlauf	4,55 bis 5,35
Animpfmenge als Trockengewicht	0,71 g/l
Trockengewicht nach 20 Tagen	8,05 g/l
Gesamtglucoseverbrauch	25,4 g/l
Glucoseverbrauch pro g Zellmasse	3,15 g
Glucoseerhaltungsspiegel in der Nachfütterungsphase	0,6%
Frischzellvolumen nach 20 Tagen	30,5%
ß-MDt-Zugabemenge bis zum 14. Inkubationstag	400,56 mg/l (8,6 g/20 l)
Durchschnittlicher ß-MDt-Spiegel pro Tag in der Nährlösung	44,3 mg/l
ß-MDg nach 14 Inkubationstagen in Nährlösung und Gewebe	262,53 mg/l (5,25 g/20 l)
Gesamtwiederfindung an ß-MDt, ß-MDg, PA, Des-C	365,01 mg/l (7,30 g/20 l)
Wiederfindungsrate	91,12%

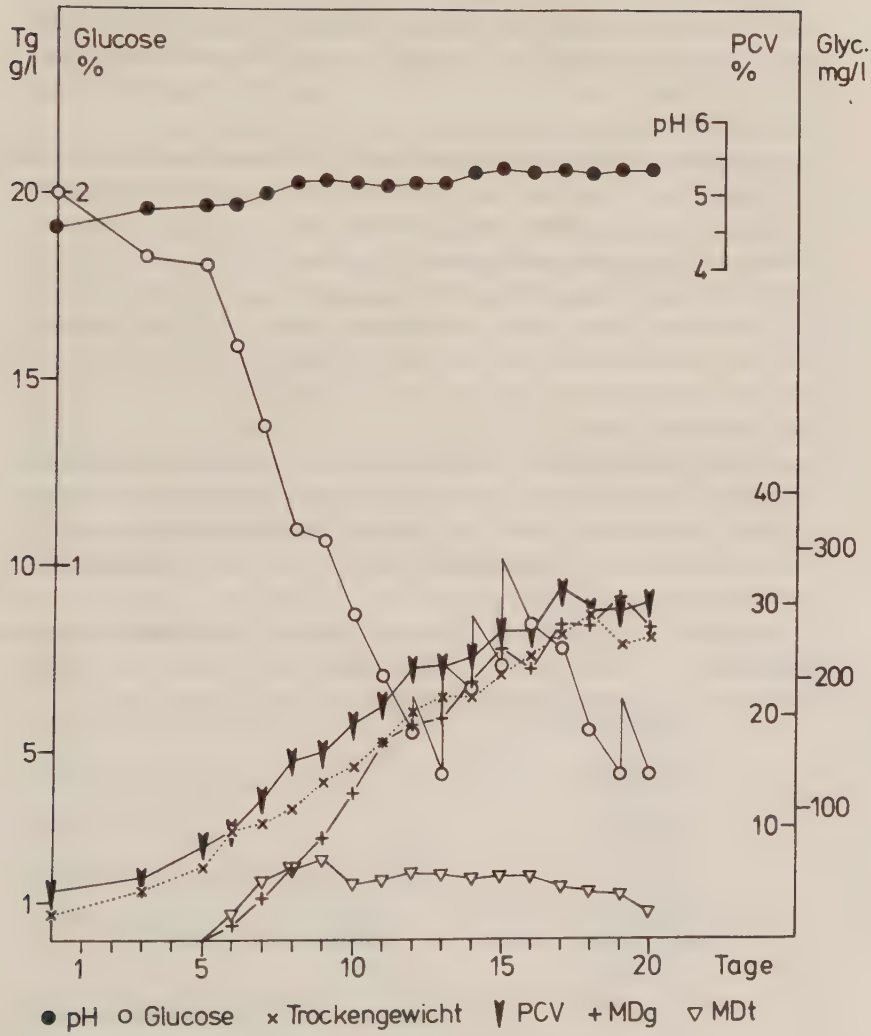


Abbildung 18: Fermentation mit Dunkelstamm 287 T - D auf MS-Medium ohne Casein mit ß-MDt-Inkubation 24°C, 350 NL Luft/h

Wie aus Abbildung 18 zu sehen ist, bestätigt sich auch im Fermenter das langsamere Wachstum, des mit ß-MDt versetzten caseinfrei gehaltenen Stammes.
Das Frischzellvolumen liegt nach 20 Tagen mit 30,5% gegenüber 46,3% und einem Trockengewicht von 8,05 g/l gegenüber 14,4 g/l stark zurück, im Vergleich zum Versuch mit Casein aus Kapitel 3.
Nach 14 Inkubationstagen waren im 20 l-Fermenter auch nur 8,6 g ß-MDt zu 5,25 g ß-MDg umgesetzt worden. Beim Dunkelstamm mit Casein waren zur gleichen Zeit schon 10,15 g/l ß-MDg im Fermenter vorzufinden (Kapitel 3).
ß-MDt- Zusatz beeinträchtigt die Lebensdauer der Fermenterkultur stark. Ohne ß-MDt-Zusatz war bisher bei dem Fermenter mit caseinfreiem Medium die längste Laufzeit von 51 Tagen erreicht worden. Bei dem oben beschriebenen Versuch waren es nur 20 Tage.
Da die Kulturen schon 17 Wochen vor Beginn der Fermentation auf einem caseinfreien Medium gehalten wurden, könnte die geringe Umsatzmenge auch auf einen fortschreitenden Prozeß hindeuten, der durch die Modifizierung des Mediums begünstigt ist.
In späteren Versuchen soll gezeigt werden, daß der Digitalisstamm 287 T - D auf einen Medium ohne Casein nach längerer Kultivierung seine Hydroxylierungsfähigkeit verliert.

7. Fermentation mit Nachfüttern von Phosphat

Es wurden zwei Phosphatsalze zur Nachfütterung verwendet: Ammoniumdihydrogenphosphat und Kaliumdihydrogenphosphat. Täglich wurde der Phosphatverbrauch in einer externen Probe photometrisch erfaßt.
Der Phosphatgehalt im Fermenter wurde möglichst auf einem Spiegel in Höhe der MS-Konzentration von 119 mg/l Phosphat (das entspricht 170 mg/l KH_2PO_4 oder 144 mg/l $(NH_4)H_2PO_4$) gehalten. Sobald der Spiegel absank, wurde über eine Pumpe soviel in den Fermenter gegeben, daß der ursprüngliche Phosphatgehalt des MS-Mediums wieder erreicht wurde.

7.1 KH_2PO_4 - Fermentation

Phosphatzusatz in Form des Kaliumsalzes wurde gewählt, weil es ohnehin Bestandteil des Murashige und Skoog-Mediums ist, und somit keine neue Komponente hinzu kam, die bis jetzt noch nicht überprüft worden war.
In Tabelle 11 sind die Daten des Fermenters erfaßt.
Aus Abbildung 19 läßt sich der Wachstumsverlauf unter KH_2PO_4-Zusatz erkennen.

Tabelle 11: Fermenterwerte bei KH_2PO_4-Nachfütterung

Fermentationsdauer	36 Tage
pH-Verlauf	4,83 bis 5,8
Animpfmenge als Trockengewicht	0,96 g/l
Trockengewicht nach 20 Tagen	18,34 g/l
30 Tagen	24,42 g/l
35 Tagen	21,20 g/l
Gesamtglucoseverbrauch	44,0 g/l
Glucoseverbrauch pro g Trockengewicht	2,4 g
Frischzellvolumen nach 20 Tagen	58,4%
30 Tagen	67,5%
35 Tagen	73,8%

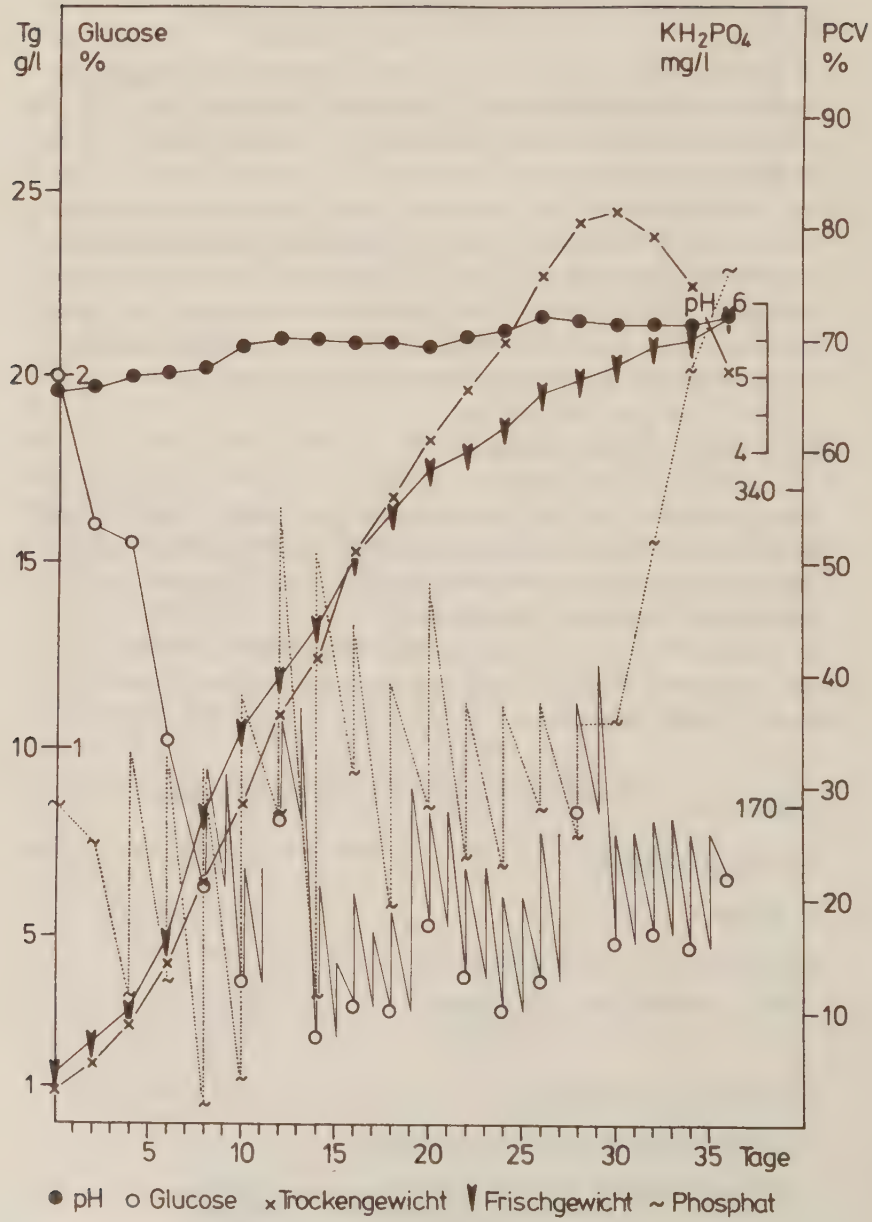


Abbildung 19: Fermentation von Digitalis lanata unter kontinuierlicher Nachfütterung von KH_2PO_4
24°C, 350 NL Luft/h

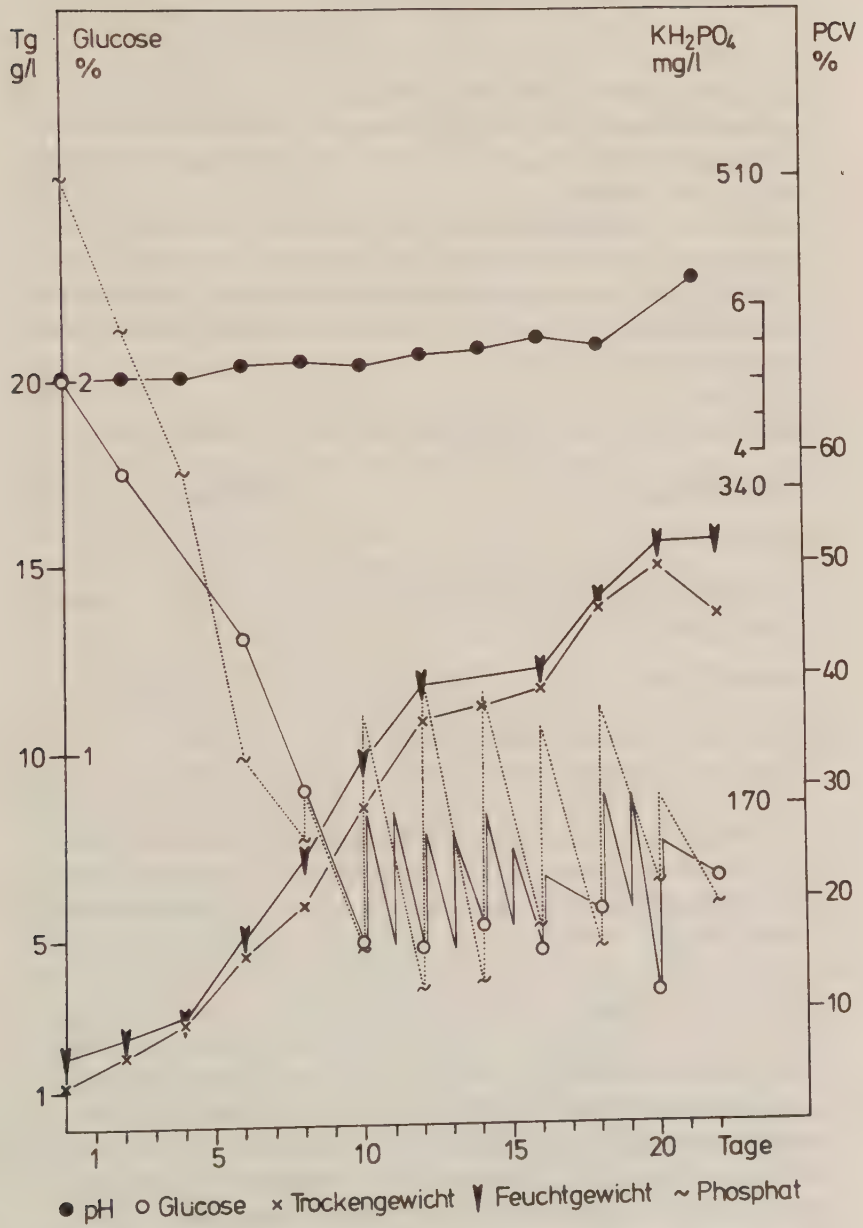


Abbildung 20: Fermentation von Digitalis lanata unter kontinuierlicher Nachfütterung von $(NH_4)H_2PO_4$

7.2 $(NH_4)H_2PO_4$ - Fermentation

Nach KATO (1977) nehmen während einer Fermentation von Tabakzellen Kaliumionen nur gering ab.
Bei Nachfütterung von KH_2PO_4 könnte es daher zu einer Anreicherunh von Kaliumionen kommen, die eventuell wachstumshemmend sein könnte.
Daher wurde Ammoniumphosphat als P-Quelle getestet, zumal Stickstoff von den Zellen essentiell benötigt wird.
In Tabelle 12 sind die Fermentationsparameter aufgelistet, und in Abbildung 20 sieht man die graphische Übersicht des Fermentationsverlaufes.

Tabelle 12: Fermenterwerte bei $(NH_4)H_2PO_4$-Zufütterung

Fermentationsdauer	22 Tage
pH-Verlauf	5,1 bis 6,4
Animpfmenge als Trockengewicht	1,14 g/l
Trockengewicht nach 20 Tagen	14,86 g/l
Gesamtglucoseverbrauch	45,2 g/l
Glucoseverbrauch pro g Trockengewicht	3,04 g
Frischzellvolumen nach 20 Tagen	51,7%

Das Medium für den $(NH_4)H_2PO_4$-Fermenter wurde gleich mit der dreifachen Menge KH_2PO_4 versetzt (510 mg/l).
Bei diesem Fermenter mußte daher erst am 8. Tag Phosphat nachgefüttert werden.

7.3 Ergebnisse

Beim Ammoniumphosphat-Fermenter mit einer Ausgangskonzentration von 510 mg/l KH_2PO_4 war in den ersten acht Tagen, gegenüber dem Fermenter mit nur 170 mg/l KH_2PO_4, eine leichte Wachstumssteigerung festzustellen. Nachfolgend sind die TG- und PCV-Zwischenwerte nach 8 Tagen angegeben.

Fermenter 170 mg/l KH_2PO_4: PCV: 27,2% TG: 6,37 g/l
Fermenter 510 mg/l KH_2PO_4: PCV: 23,9% TG: 5,96 g/l

Die Phosphatnachfütterung steigerte bei der KH_2PO_4-Fermentation deutlich das Wachstum. Nach 30 Tagen waren 24,42 g/l Trockengewicht erreicht. Dies ist höher, als bei der P-Fermentation aus Kapitel 5.2, wo 23,9 g/l nach 35 Tagen erreicht wurden.
Im Vergleich zum Wachstumsfermenter aus Kapitel 2, wo nur das Phosphat verwertet werden konnte, was zu Beginn der Fermentation vorgelegt wurde (170 mg/l), lebten die Zellen hier wesentlich länger.
Bei einem konstanten Phosphatangebot mittels Nachfütterung, lag hier die Lebensdauer bei 36 Tagen, während nach einmaliger Phosphatversorgung die Zellen schon am 20. Tag dunkler wurden und abstarben.
Die Zugabe von Phosphat als Ammoniumsalz ergab allerdings keine Verbesserung gegenüber dem Zusatz von KH_2PO_4. Der Fermenter schäumte sogar mehrmals über, was eine erhebliche Störung der Zellen anzeigte.
Der pH am Ende der Fermentation war mit 6,4 gegenüber dem KH_2PO_4-Fermenter mit 5,8 sichtlich erhöht.
Nach 20 Tagen blieb das Trockengewicht mit 14,86 g/l sogar erheblich zurück, wogegen es beim KH_2PO_4-Zugabefermenter bei 18,34 g/l lag.
Auch die Laufzeit war mit 22 Tagen gegenüber 36 Tagen eindeutig verkürzt.
In Abbildung 19 sieht man erst nach 30 Tagen einen Abfall des Trockengewichtes und gleichzeitig einen Anstieg des Phosphats. Das weist auf eine Lyse der Zellen hin.
Hier steigt das Trockengewicht sogar stärker an als das Frischzellvolumen, vermutlich durch verstärkten Einbau von Resevestoffen.
Der Versuch zeigt, daß es in bezug auf Zellwachstum günstiger ist KH_2PO_4 , anstelle von $(NH_4)H_2PO_4$ nachzufüttern.

8. Methyldigitoxingewöhnungsversuche

8.1 Zugabe von unterschiedlichen ß-MDt-Mengen

Es sollte eine Selektion von Zellen stattfinden, die ß-MDt in höheren Dosen, als die üblichen 40 mg/l, tolerieren und zu ß-MDt umsetzen.
Um eine bessere ß-MDt-Resistenz bei gleichbleibend hoher Hydroxylierungsfähigkeit zu erzeugen, sollten die Digitaliszellen auf ß-MDt-Medium weitergeimpft und diejenigen herausselektioniert werden, die die toxische MDt-Behandlung überdauert haben.
Bei einer Passagendauer von 7 Tagen wurden in Parallelansätzen die Zellen am Umimpftag mit 40 mg/l (M_1), 80 mg/l (M_2) und 120 mg/l (M_3) immer wieder inkubiert.
Nach jeweils 7 Tagen (1 Passage) wurden der pH, die Leitfähigkeit, Glucosegehalt, Frischgewicht und der Umsatz von ß-MDt zu ß-MDg gemessen. Auch wurde jeweils 30 g des unter MDt-Zusatzes weiter gewachsenen Gewebes herausgenommen, und auf frisches MDt-Nährmedium gesetzt.
Nach 7 weiteren Tagen wurde entsprechend verfahren.
Zu den drei MDt-Stämmen mit unterschiedlicher Dosierung wurde als Vergleich eine Zellinie ohne MDt-Zusatz mitgeführt.
In Abbildung 21 sind die Meßwerte über 40 Wochen dargestellt.

8.2 Dauergewöhnung an 40 mg/l ß-MDt auf einem caseinfreien Medium

Nach längerer Vorzucht auf caseinfreiem Medium wurden zu 30 g Frischgewicht in 300 ml MS-Medium 12 mg ß-MDt (40 mg/l) steril einpipettiert.
Jede Woche, am Passagenende, wurde das Wachstum durch das Absetzvolumen bestimmt, der pH, der Glucoseverbrauch, die Leitfähigkeit und die umgesetzte Menge an ß-MDt gemessen.
Sobald keine Hydroxylierungs-Aktivität mehr erkennbar war, wurde auf die Grundstämme ohne MDt zurückgegriffen, und

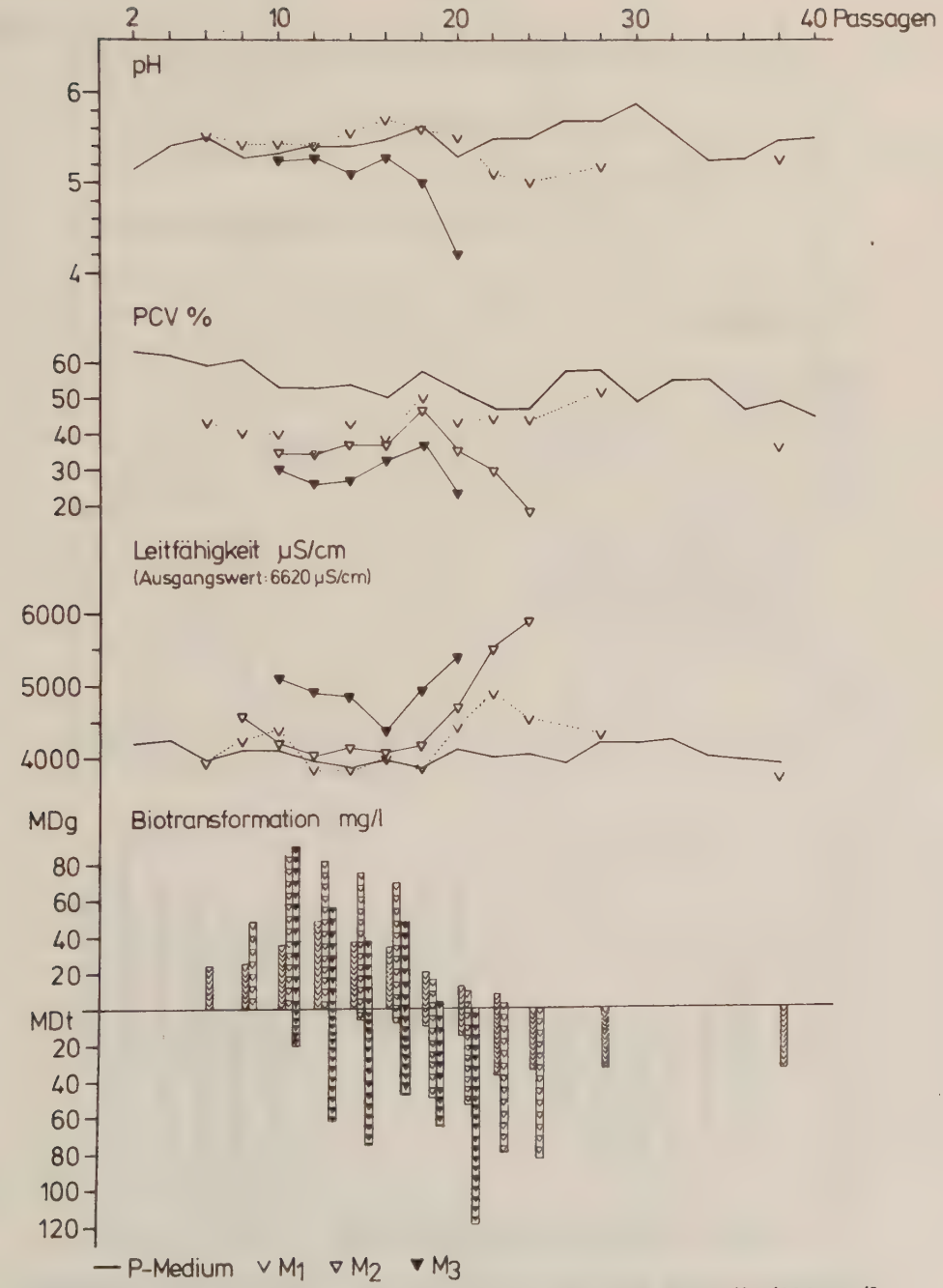


Abbildung 21: Meßwerte aus dem Gewöhnungsversuch an 40/80/120 mg/l ß-MDt bei Suspensionskulturen von Digitalis lanata

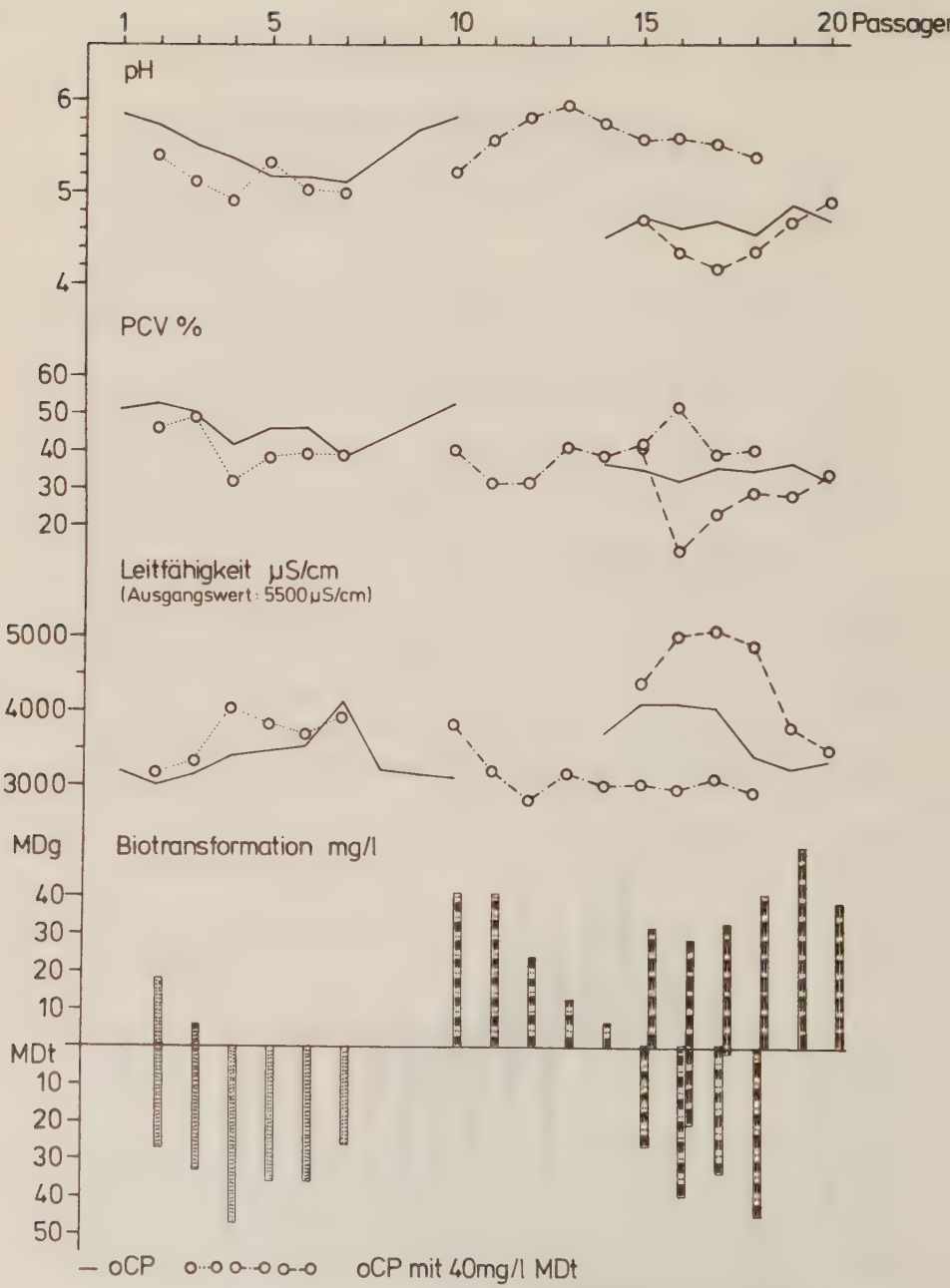


Abbildung 22: Meßwerte aus dem Gewöhnungsversuch an 40 mg/l ß-MDt bei Suspensionskulturen von Digitalis lanata auf einem caseinfreien Medium

erneut zwei Kolben in der zuvor beschriebenen Weise mit Substrat versetzt.
In Abbildung 22 ist der Verlauf des Versuches über 20 Wochen hinweg wiedergegeben.

8.3 Kontinuierliche Zugabe von ß-MDt

In dieser Versuchsanordnung wurden 30 g Digitaliszellen, die zuvor kein ß-MDt erhalten hatten, auf frisches Nährmedium mit 40 mg/l ß-MDt gesetzt.
Jeden 2. Tag wurde aus 4 ml entnommener Probe, die Abnahme des Substrates gemessen. Bei einer Konzentration von 10 bis 20 mg/l wurden erneut 40 mg/l ß-MDt zugegeben.
Verbrauchte Glucose wurde als 40%ige Glucoselösung nachgefüttert, so daß immer ausreichend Zucker vorhanden war.
Nach 14 Tagen hatten die Zellen noch dieselbe gelbe Farbe wie am Umimpftag, danach änderte sie sich bis zum 27. Tag über gelbgrau, grünlich, hellbraun, rötlich. Die rotbraune Farbe zeigte die Absterbephase, bei der Phenole gebildet werden an. Auch der erneute Auftritt von Phosphat im Medium zeigte die Lyse der Zellen an.
Auf Abbildung 23 ist der Hydroxylierungsverlauf unter Glucosenachfütterung zu sehen.

8.4 Selektion aus 8.3

Nach 21 Tagen wurden aus dem schon braunen Zellmaterial mit rötlichem Überstand vereinzelte helle Zellkonglomerate entnommen und in frisches Nährmedium ohne Methyldigitoxin überführt.
Nach entsprechender Vermehrung wurde der Versuch wie unter 8.3 mit den selektionierten Zellen wiederholt.
Abbildung 24 zeigt die Selektion aus Versuch 8.3.

8.5 Methanolzugabe

Im gleichen Rhythmus wie in Versuch 8.3 wurde hier aus-

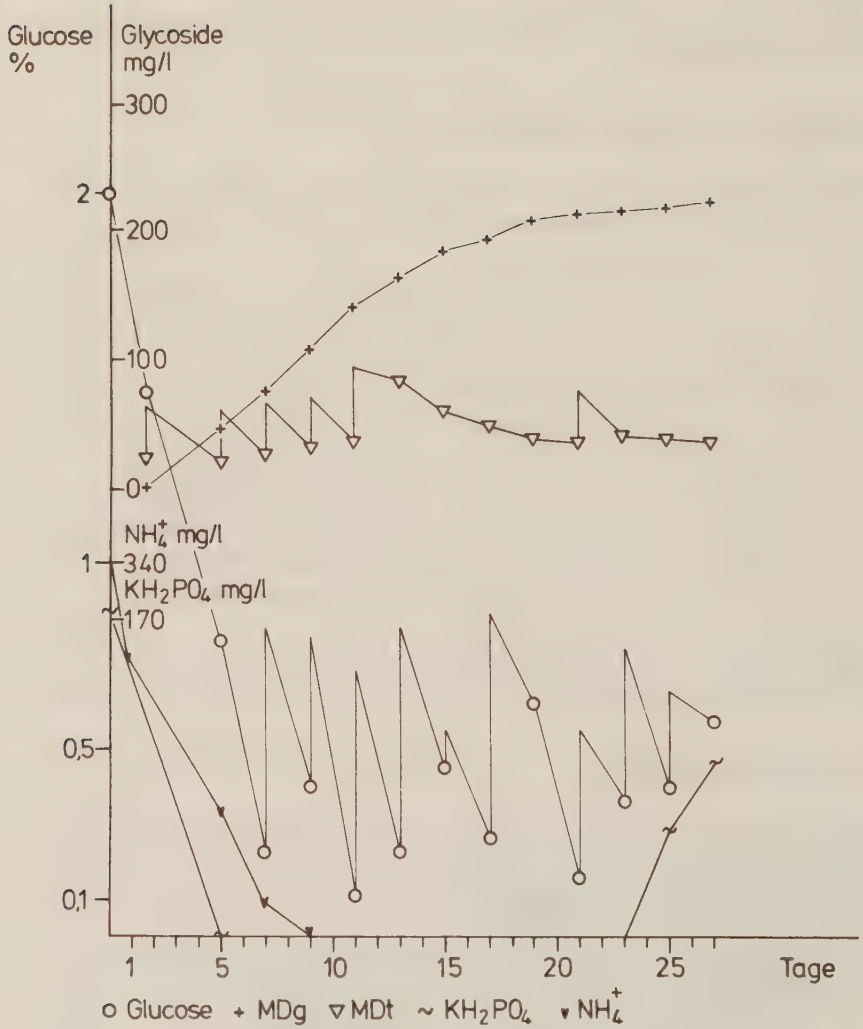


Abbildung 23: Hydroxylierung unter kontinuierlicher ß-MDt-Zugabe (40 mg/l), in Suspensionskulturen von Digitalis lanata mit Glucosenachfütterung, Beobachtung von Ammonium und Phosphat

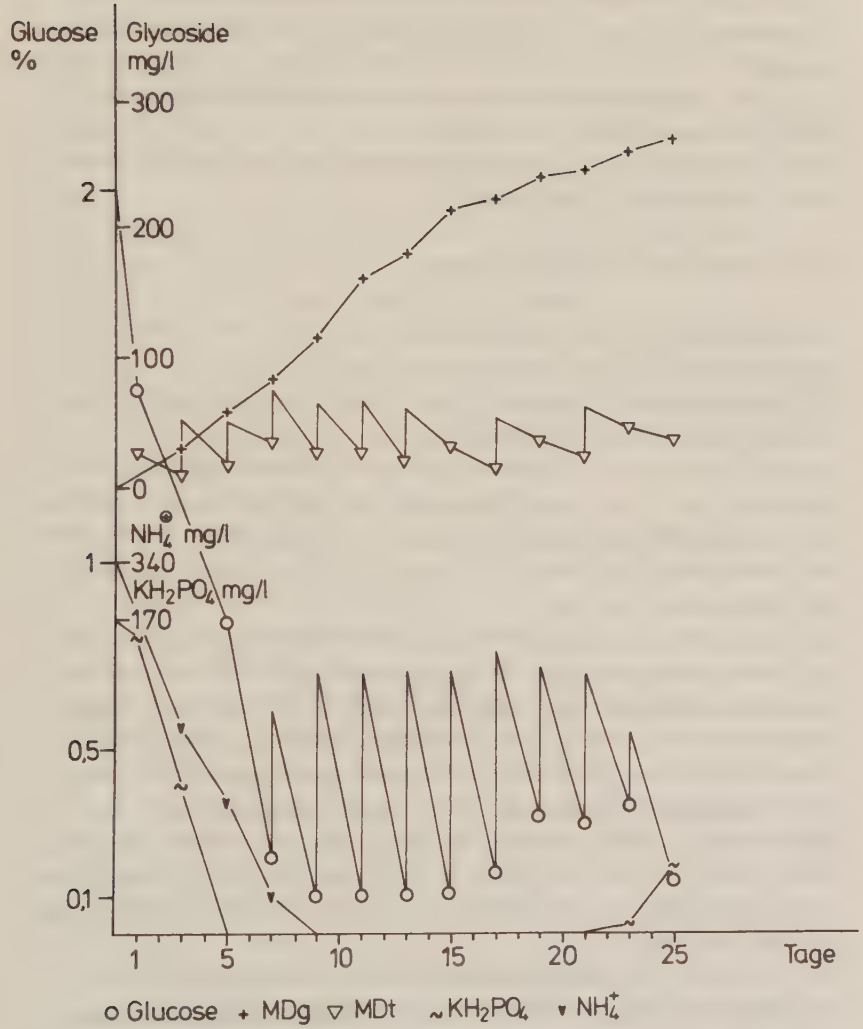


Abbildung 24: Hydroxylierung unter kontinuierlicher ß-MDt-Zugabe mit selektionierten Digitaliszellen im 1 l-Erlenmeyerkolben

schließlich Methanol statt ß-MDt (in Methanol gelöst) den Erlenmeyerkolben mit 30 g Frischgewicht an Digitaliszellen zugegeben.
Mit einem zeitlichen Verzug von 4 Tagen veränderten die Zellen gleichermaßen ihre Farbe.
So läßt sich der toxische MDt-Effekt fast nur auf die Methanolzugabemenge zurückführen.

8.6 Ergebnisse und Diskussion

Aus Abbildung 21 läßt sich zeigen: Je mehr ß-MDt in der Nährlösung ist, umso tiefer sinkt der pH.
Am Sinkvolumen ist eindeutig der wachstumshemmende Einfluß des MDt-Substrates ersichtlich.
Die Abnahme der Leitfähigkeit von ursprünglich 6620 $\mu S/cm^{-1}$ resultiert aus dem Ionenverbrauch. Da bei geringem Wachstum kaum Nährstoffe verbraucht werden, zeigt sich hier der Unterschied zwischen M_1 und M_3 in einer erhöhten Leitfähigkeit des Letzteren.
Die Zugabe von 40 mg/l ß-MDt zur Nährlösung wurde bis zur 11. Woche jeweils vollständig umgesetzt. Danach war am Passagenende immer noch ein Rest an nicht verbrauchtem ß-MDt wiederzufinden, und in der weiteren Subkultivierung verloren die Zellen vollständig ihre Hydroxylierungsfähigkeit. Auch Monate danach war sie nicht mehr nachzuweisen.
80 mg/l (M_2) wurden zu Beginn auch noch vollständig umgesetzt. Schon in der 6. Woche blieb aber ein Rest nicht umgesetztes MDt übrig. 4 Wochen später fand man kein hydroxyliertes MDt wieder.
Bei 120 mg/l ß-MDt (M_3) wiederholten sich die Ergebnisse, die schon von den geringeren Dosierungen erhalten wurden, nur daß der Verlust der Biotransformationskapazität schon früher auftrat.
Das mag aber auch an den hohen toxischen Substratkonzentrationen liegen, die ein Wachstum und damit Entwicklung der Enzymtätigkeit unmöglich machten.
Der Versuch wurde abgebrochen, als durch das geringe Wachs-

tum nicht mehr genug Zellmasse zum Überimpfen vorhanden war.
Aus einer ursprünglich einheitlichen Zellkultur differenzieren sich im Verlauf der Zeit unterschiedliche Zellinien heraus, die sich erheblich in ihren Stoffwechselleistungen unterscheiden. Diese Variabilität läßt auch einen vollkommenen Verlust der Biotransformation bei längerer Kultur erklären.
Ähnlich sieht es bei dem Versuch mit dem caseinfreien Medium aus, nur daß der Verlust der Hydroxylierungsfähigkeit noch schneller herausselektioniert wurde.
In der 10. Woche wurde neues Zellmaterial eingesetzt, das zu Beginn noch alles MDt umsetzen konnte, bis diese Eigenschaft bis zur 18. Woche wieder rapide abnahm.
Ab der 19. Woche wurde wieder eine neue noch aktive Zelllinie im Versuch beobachtet. Diese verwertete schon bald auch nicht mehr alles Substrat zu MDg.
Bestimmte Kulturmedien begünstigen die Veränderung der Pflanzenzellen.
Versuch 8.2 läßt erkennen, daß eine kontinuierliche Fermentation mit ß-MDt-Zugabe auf einem caseinfreien Medium nicht länger als 10 Wochen dauern dürfte, ohne in die Gefahr zu kommen, daß die Zellkultur, daß die Zellkultur auf diesem Medium aufhört zu hydroxylieren.
Es zeigt sich, daß es besser ist, im batch-Verfahren die Zellen mit kontinuierlicher MDt-Zugabe zu versorgen, da sie sich in einem kürzeren Zeitraum nicht so stark selektionieren lassen.
Auch das Selektionsverfahren, wie Versuch 8.4 erläutert, war nicht so erfolgversprechend, wie man erhofft hatte.
Es wurde insgesamt 40 mg/l mehr hydroxyliert.
Hingegen berichtet KOCHBA et al (1978) über einen erfolgreichen Selektionsversuch, Salzresistenz bei Citruskulturen zu erzeugen.
Auch BARG und UMIEL (1978) erreichten eine Herbizidresistenz bei Tabakgewebekulturen.
Bei diesem Versuch wurde zwar auch eine Gewöhnung an MDt erreicht, aber das bezweckte Ziel der erhöhten Hydroxylie-

rung wurde nicht erreicht.
Es wurden die Zellen herausselektioniert, die gegen MDt resistent sind, und die hydroxylierenden sensiblen Zellen überwuchsen.
Als wichtigstes Ergebnis zeigen die beschriebenen Versuche, daß man die Zellkultur laufend auf ihre Hydroxylierungsfähigkeit hin überwachen muß, daß aber die kontinuierliche Subkultivierung unter dauerndem MDt-Einfluß nicht das geeignete Mittel darstellt, um hoch hydroxylierende Stämme zu erhalten.
Als Lösung bietet sich an, immer frisches Zellmaterial von Kalluskulturen in Suspension zu nehmen und in regelmäßigen Abständen immer wieder auf ihre Hydroxylierungsfähigkeit zu testen.

9. Stammhaltung im Hinblick auf die Hydroxylierungsstastabilität

Es ist eine Tatsache, daß intensive Studien für eine mögliche industrielle Nutzung unvollständig wären, ohne die erfolgreiche Suche nach Hochleistungsstämmen.
Es ist außerordentlich wichtig, diese hochproduzierenden Laborstämme zu erhalten und ständig zu überwachen.
Trotz alledem ist es ein bekanntes Problem, die Hydroxylierungsfähigkeit über lange Perioden stabil zu erhalten.
Die allgemeine Beobachtung geht dahin, daß das Zellmaterial in seinen morphogenetischen und enzymaktiven Potential abnimmt, was die Optimierung der Naturstoffproduktion stark erschwert.
Catharanthus-Kulturen von ZENK (1978 a) entwickelten sich über Jahre hinweg, von einem produzierenden , zu einem nicht produzierenden Stamm.
WEST und MIKA (1957) zeigten bei Atropa belladonna einen starken Abfall der Sekundärstoffbildung mit steigender Zahl der Passagen.
Auch bei Kulturen von Conium maculatum trat derselbe Fall ein (NETIEN und COMBET 1971).
TORREY (1967) berichtet über cytologische Abnormitäten bei Pisum sativum-Zellen, die längere Zeit subkultiviert wurden. Die Kulturen wurden polyploid, oder sie verloren Teile der Chromosomen.
Im Gegensatz dazu blieben Morinda, Galium und Daucus-Kulturen stabil, da diese durch das Produkt das sie bilden, gefärbt sind, und so leicht selektioniert werden können (ZENK 1978 b).
Ohne erhebliche Schwierigkeiten dürfte auch die Selektion bei Zellen verlaufen, die fluoreszierende oder antibiotisch wirksame Stoffe erzeugen.
Auch Hochleistungsstämme, die einmal selektioniert worden waren, können ihre Hydroxylierungsfähigkeit entweder sogar noch steigern, oder aber auch verlieren.
Bei jedem Transfer in ein frisches Medium schließt man so

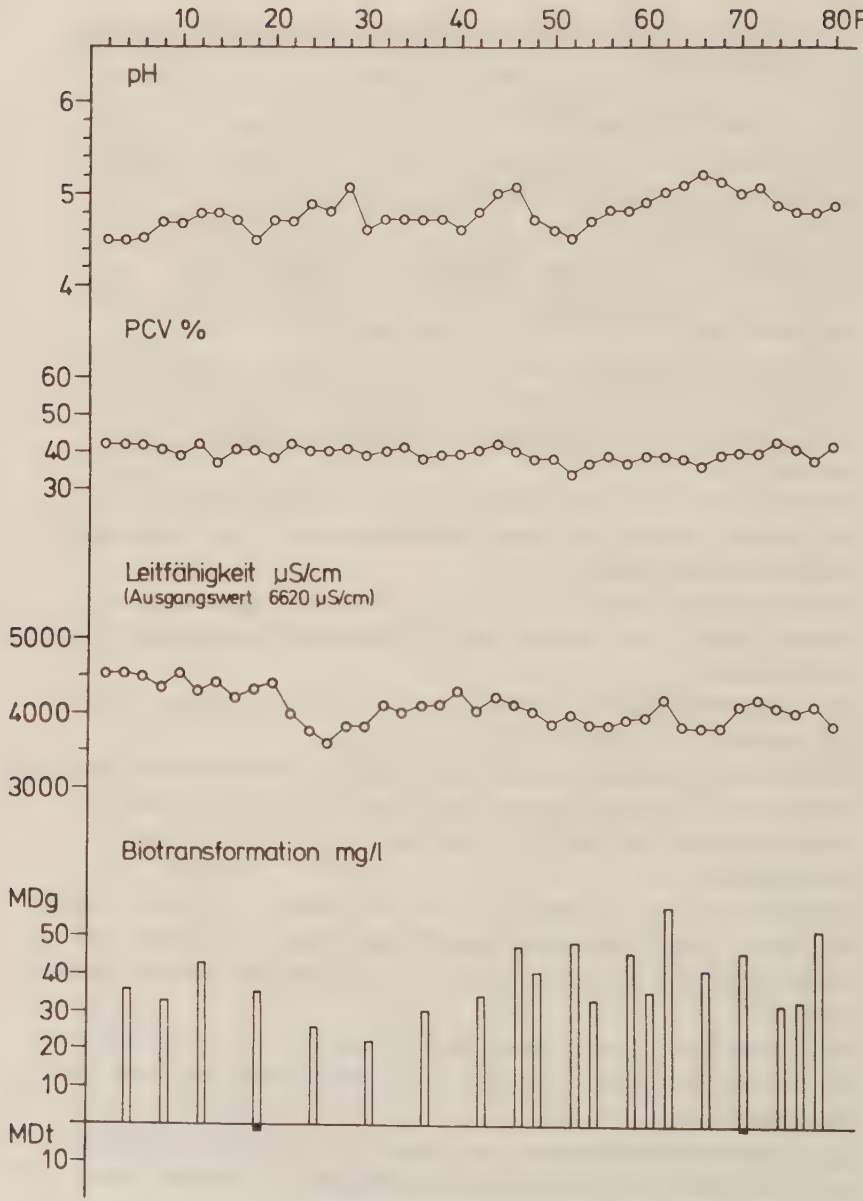


Abbildung 25: Jeweils am Passagenende erhaltene Meßwerte von Digitalis lanata in Suspensionskulturen während Subkultivierung über 80 Passagen im Hinblick auf die Hydroxylierungsstabilität

die Änderungen, die auf Mutationen, Genkombinationen und epigenetischen Faktoren beruhen, mit ein.
Um due Hydroxylierungsaktivität zu erhalten, bedarf es sowohl der Wahl des geeigneten Kulturmediums, als auch der richtigen Zellinie.

Um gleichbleibende Fermentererfolge zu erzielen, ist es unerläßlich, die Zellkulturen nach jedem Umsetzen auf frisches Nährmedium, auf folgende Punkte zu überprüfen:
- auf gutes Wachstum,
  dies kann schnell über das Frischzellvolumen (PCV) ermittelt werden.
- auf konstante Abnahme der Makro- und Mikroelemente,
  einen schnellen Überblick erhält man mittels einer Leitfähigkeitselektrode.
- auf den pH,
- auf gleichmäßige Glucoseutilisation,
- auf die fortbestehende Hydroxylierungsfähigkeit.

Durch diese Untersuchungen lassen sich leicht die gut hydroxylierenden von den weniger guten trennen und danach weiterkultivieren.
Abbildung 25 zeigt ein Stammüberwachungsbild der Zellinie 287 T - D auf MS-Medium mit einfach erhöhter Phosphatmenge (340 mg/l KH_2PO_4).
Durch eine breit angelegte, sorgfältig überwachte Stammhaltung können so immer die besten Zellinien für Fermenterversuche verwendet werden.
Schon 1978 weisen TABATA et al. darauf hin, daß die periodische Überprüfung der Zellstämme notwendig ist, um ein konstantes Produktionsniveau zu erhalten.

Diese Aufbewahrung der Zellstämme im Labor, durch Überimpfen und Kultivieren, erfordert einen großen Zeitaufwand.
Eine Teillösung dieses Problems bietet LUCKNER (1982) an, indem er Digitalis lanata Stämme tiefgefriert und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Nach dem Auftauen überlebten 50% der Zellen diese Kryokonservation und zeigten die gleichen Eigenschaften wie vor der Kältebehandlung.

10. Untersuchungen der Makroelemente

Neben der Selektionierung von Zellvarianten mit gleichbleibender oder gesteigerter Hydroxylierung können die Ernährungsfaktoren eine große Rolle spielen, wenn man kontrolliert zu einer Erhöhung des gewünschten Produktes kommen will.
Die Kenntnis des Ionenverbrauchs ist ein wichtiger Faktor für die Züchtung von Pflanzenzellen, da es die Biomasse und die Sekundärstoffproduktion in unterschiedlicher Weise beeinflußt.
Besondere Aufmerksamkeit sollte auch auf den Verbrauch des Substrates im Hinblick auf niedrigere Kosten für das Nährmedium gelegt werden. Ein Vorteil der Pflanzenzellkulturen ist, daß sie auf einem einfachen synthetischen Medium wachsen können.
Bis jetzt gibt es nur wenige Studien, die gründlich den Verbrauch der Medienkomponenten parallel zum Wachstum, und der eventuellen Interaktion mit der 12 ß-Hydroxylierung, im Fermenter untersucht haben.
Normalerweise steigt die biotransformatorische Aktivität bei kultivierten Zellen mit dem Zellwachstum, der Zellteilungsrate und dem entsprechenden Substratverbrauch an.
So ist es von großem Interesse, den Verbrauch von einzelnen Ionen im Nährmedium zu verfolgen, um gegebenfalls regulierend und damit auf die Biotransformation steigernd einzuwirken.
Auch bedarf es einer Analyse des Nährmediums, nicht erst im Fermenter, sondern schon während der Vorkultur im Erlenmeyerkolben, um genau zu wissen, welche der zugesetzten Elemente überhaupt gebraucht werden.
Die anorganischen Ionen (Tabelle 13) des Murashige und Skoog-Mediums interferieren bei ihrer Identifizierung untereinander, so daß es nur durch langwierige Voruntersuchungen möglich war, jeweils die störenden Faktoren zu maskieren, oder zu eliminieren.
Die Bestimmung der Ionen ist im Teil "Material und Methoden" ausführlich beschrieben.

Tabelle 13: Aufgliederung des MS-Mediums in seine Makroelemente

Nitrat	NO_3^-	2433,65 mg/l	39,4 mmol
Kalium	K^+	782,04 mg/l	18,8 mmol
Ammonium	NH_4^+	371,25 mg/l	20,6 mmol
Chlorid	Cl_2^-	212,72 mg/l	3,0 mmol
Sulfat	SO_4^{2-}	166,19 mg/l	1,73 mmol
Calcium	Ca_2^{2+}	120,24 mg/l	3,0 mmol
Phosphat	PO_4^{3-}	119,00 mg/l	1,25 mmol
Magnesium	Mg^{2+}	36,47 mg/l	1,5 mmol

10.1 Beobachtungen der Makroelemente während einer Passage

Um eine genaue Übersicht der täglichen Zuwachsrate des Trokkengewichtes und der Ionenabnahme in Prozent während einer Passage zu erhalten, wurde jeden Tag ein Kolben der laufenden Passage geerntet und untersucht.
Der Ionenausgangsgehalt des Nährmediums wurde zu Beginn der Passage bestimmt.
Abbildung 26 zeigt den täglichen Ionenverbrauch in Abhängigkeit des Wachstums.
Nach einer lag-Periode von 1 bis 2 Tagen stieg das Frischgewicht von einer Animpfmenge von 9,9% auf 36,6% an.
Gleichermaßen dazu wuchs das Trockengewicht von 2,5 g/l auf 8,3 g/l an.
Von der gesamten Phosphatmenge von 119 mg/l waren schon am 4. Tag nur noch Spuren detektierbar.
Sulfat sank über die Hälfte, von 152 mg/l auf 56 mg/l ab.
Der Ammoniumverbrauch ging bis zum 4. Tag konform mit dem Sulfatverbrauch, fiel dann aber schnell bis zum 7. Tag fast auf Null ab.
Vom Nitrat, als dem mit 2480 mg/l in der höchsten Konzentration vorliegendem Ion, wurden bis zum 7. Tag 1446 mg/l metabolisiert.

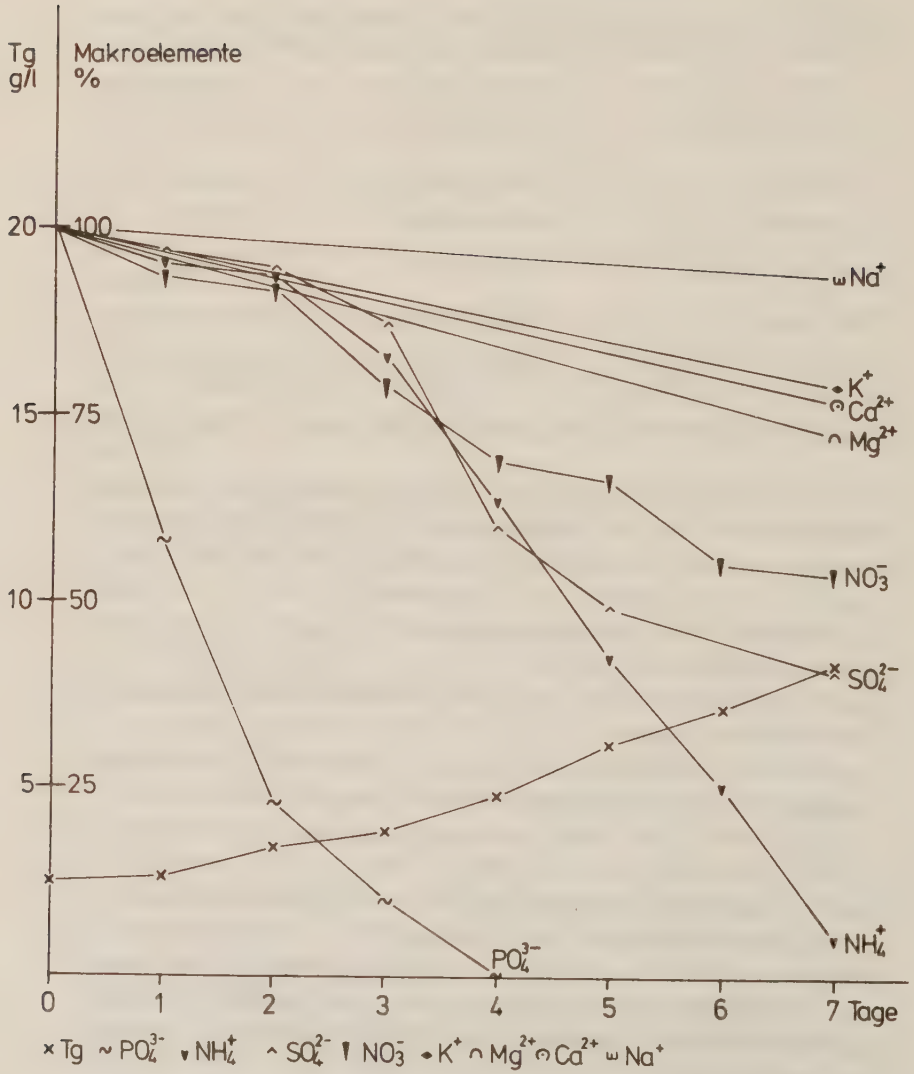


Abbildung 26: Verbrauch der Makroelemente innerhalb einer Passage (7 Tage) in Suspensionskulturen von Digitalis lan. im Vergleich zum Anstieg des Trockengewichts

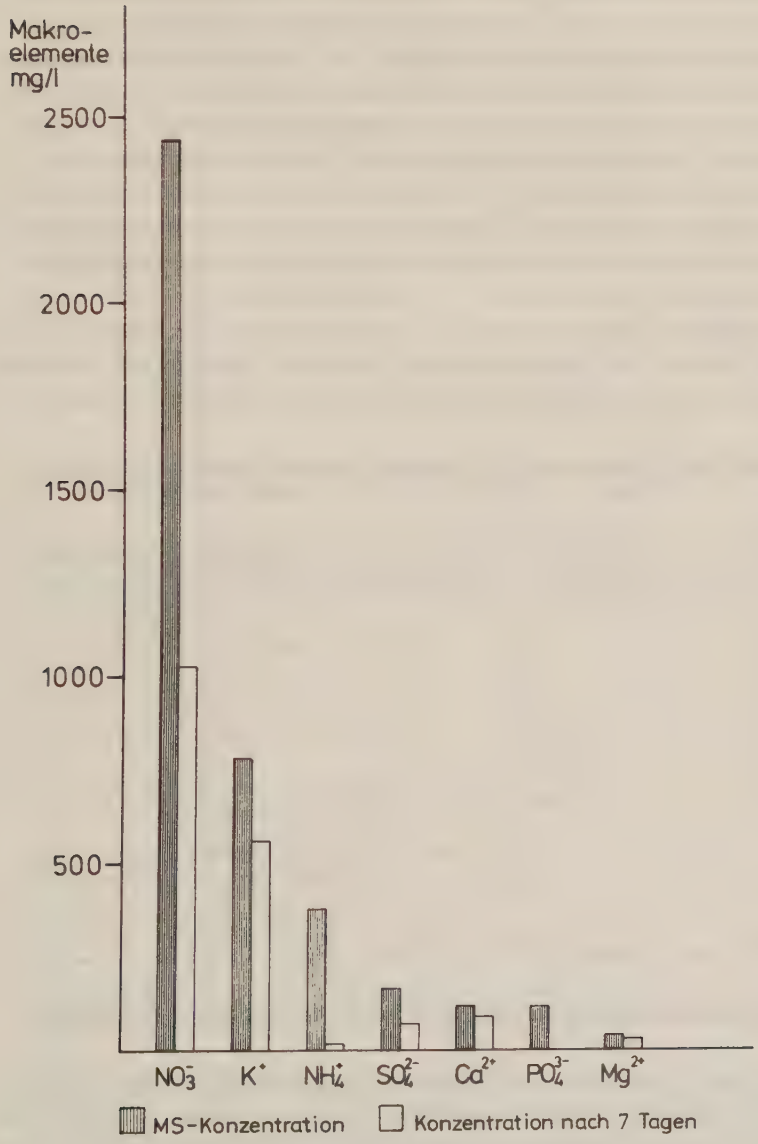


Abbildung 27: Konzentration der Makroelemente im Murashige und Skoog Nährmedium und Abnahme in mg/l während 7 Tage Passagendauer mit Suspensionskulturen von Digitalis lanata

Natrium, mit nur 4,6 mg/l (0.2 mmol), gehört zwar nicht zu den Makroelementen, aber durch den Zusatz an Casein wird dieses Alkalimetall sogar bis zu 200 mg/l, je nach Caseincharge, gefunden. Nach 7 Tagen waren von den zu Beginn gemessenen 83 mg/l kaum eine Abnahme festzustellen.
Von dem mit 716 mg/l eingesetzten Kalium wurden hingegen 150 mg/l verbraucht.
Tabelle 14 gibt einen Überblick über die Ausgangs- und Endmengen der im 1000 ml Erlenmeyerkolben mit 300 ml Medium gefundenen Makroelemente.
In Abbildung 27 ist in einer Blockübersicht die Konzentration des MS-Mediums aufgezeigt, und der leere Block daneben zeigt die davon übriggebliebene Menge nach einer Woche an.

Tabelle 14: Verbrauch der Makroelemente innerhalb von 7 Tagen, geordnet nach dem Ausmaß der Abnahme

Ion	gefundener Anfangsgehalt mg/l im Nährmedium	Endmenge der Makroelemente im Nährmedium
PO_4^{3-}	119	0 (4. Tag)
NH_4^+	346	39
SO_4^{2-}	152	56
NO_3^-	2480	1034
K^+	716	566
Mg	36	26
Ca^{2+}	120	92
Na^+	83	77

10.2 Verbrauch der Makroelemente im Wachstumsfermenter

Um genaue Aussagen über den Ionenverbrauch in einem Fermenter zu machen, kann man allerdings nur bedingt Rückschlüsse von einem 1 l-Kolben auf einen 20 l-Airliftfermenter ziehen. Es sind detaillierte Untersuchungen auch für ein 20 l-Reaktionsgefäß notwendig, zumal sich die Schüttelfrequenz, die

Sauerstoffverteilung und Belüftung, das Strömungsverhältnis und die Scherkräfte stark unterscheiden.
WAGNER und VOGELMANN (1977) stellten vergleichende Untersuchungen in verschiedenen Reaktoren an, und fanden dort zwar die gleiche Wachstumsrate, aber einen unterschiedlichen Sekundärstoffgehalt in Abhängigkeit von Behältnis.
Durch vorhergehende Untersuchungen ist ein gesteigertes Wachstum durch erhöhten Phosphatgehalt erreicht worden.
Aus diesem Grunde wurde hier das MS-Medium mit weiteren 170 mg/l KH_2PO_4 supplementiert.
Der Fermenterverlauf bezüglich Lebensdauer, Glucoseverbrauch, PCV und pH ist der Tabelle 15 zu entnehmen.
Abbildung 28 zeigt den Verlauf der Fermentation über 24 Tage.

Tabelle 15: Wachstumsfermenter unter Beobachtung der Makroelemente

Fermentationsdauer	24 Tage
pH-Verlauf	4,9 bis 4,95
Animpfmenge als Trockengewicht	1,23 g/l
Trockengewicht nach 20 Tagen	15,6 g/l
Glucoseverbrauch in 20 Tagen	59,7 g/l
Durchschnittlicher Glucoseverbrauch pro g Trockengewicht	3,8 g
Durchschnittlicher Glucosespiegel in der Nachfütterungsphase	3,25%
Frischzellvolumen nach 20 Tagen	76,1%

Wenn man die Abbildung 29 anschaut, sieht man dort die Abnahme der Makroelemente gegen das Trockengewicht aufgetragen.
Erstaunlich ist die schnelle Abnahme von Phosphat bis zum 12. Tag; auch von Ammonium und Sulfat war am 15. Tag schon nichts mehr nachzuweisen. Vom Nitrat ließen sich bis zum Fermentationsende noch etwa 10% der Ausgangsmenge auffinden. Calcium, Magnesium und Kalium nahmen dagegen nicht so ra-

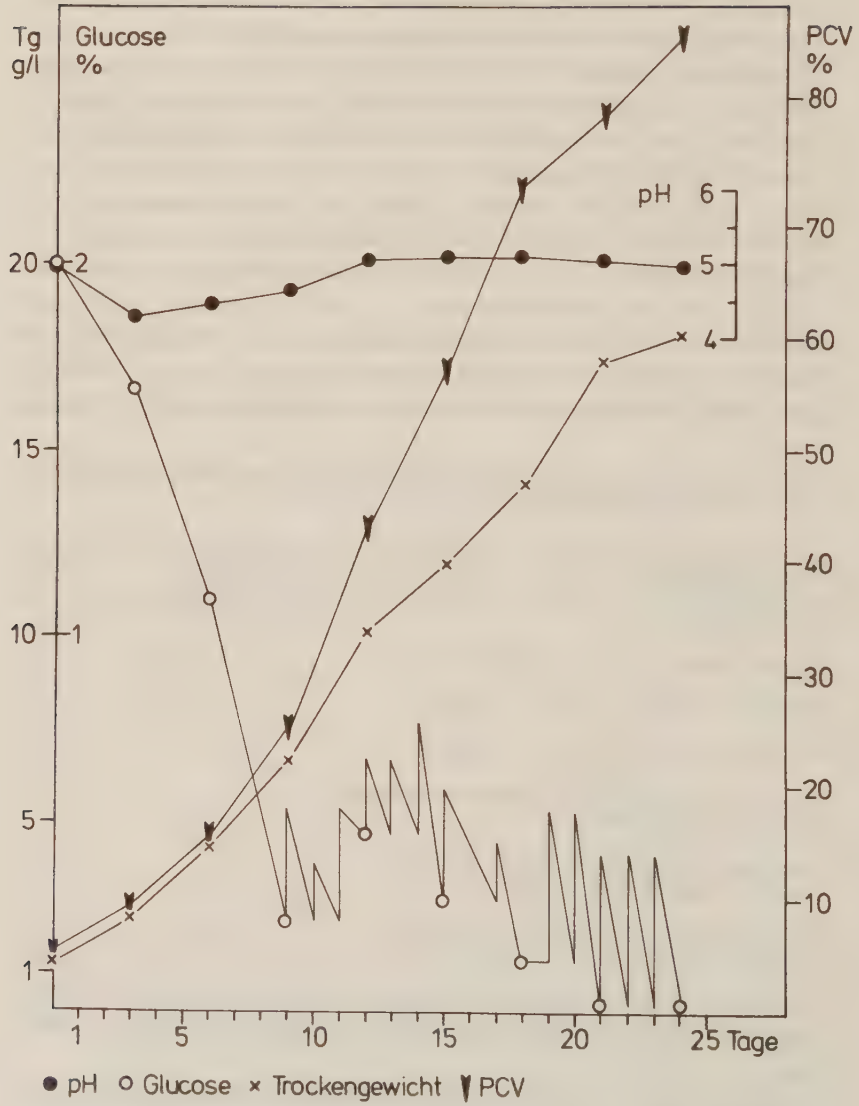


Abbildung 28: Wachstumsfermenter von Digitalis lanata mit 340 mg/l Phosphat (KH_2PO_4) unter Beobachtung der Makroelemente

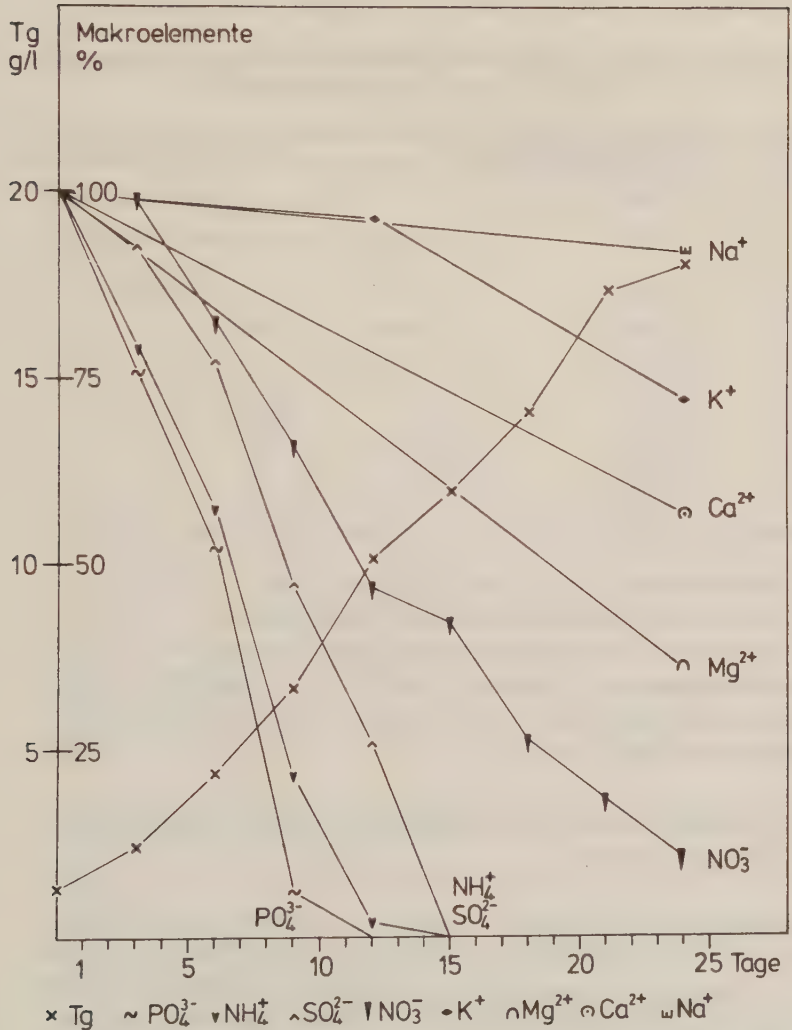


Abbildung 29: Abnahme der Makroelemente im Wachstumsfermenter von Digitalis lanata im Vergleich zum Anstieg des Trockengewichts

pide ab, während vom Natrium kaum etwas aufgenommen wurde. Tabelle 16 zeigt die Werte zu Beginn und am Ende der Fermentation.

Tabelle 16: Ionenabnahme im Fermenter bis zum 24. Tag, nach der Reihenfolge der Abnahme geordnet

Ion	Anfangsgehalt mg/l	Endgehalt mg/l
PO_4^{3-}	207	0 (12. Tag)
NH_4^+	332	0 (15. Tag)
SO_4^{2-}	188	0 (15. Tag)
NO_3^-	2567	240
Mg^{2+}	33	13
K^+	775	563
Ca^{2+}	123	68
Na^+	263	242

Der Natriumgehalt ist im Vergleich zu Tabelle 14 so hoch, weil eine andere Caseincharge verwendet wurde.
Auch während des Fermentationsverlaufes verhielten sich die Hauptmakroelemente, Phosphat, Ammonium und Sulfat, in der gleichen Abnahmefolge, wie während einer Passagenkultur im Erlenmeyerkolben.

10.3 Verbrauch der Makroelemente in einem Fermenter mit ß-MDt-Zugabe

Es stellt sich die Frage, ob die Abnahme der Ionen im Fermenter und die daraus folgende unzureichende Versorgung der Zellen, einen Einfluß auf die Hydroxylierungs-Aktivität hat. Somit wurde ein Fermenteransatz, diesmal mit ß-MDt-Zugabe, genauso auf die tägliche Ionenkonzentration untersucht, wie bei der vorangegangenen Fermentation.
Als weitere Untersuchungskomponente wurde der Sauerstoffpartialdruck im Fermentermedium mittels O_2-Elektrode gemes-

sen. Die Belüftungsrate blieb während der Fermentation konstant bei 350 NL Luft/h.
Tabelle 17 gibt die Fermentationsdaten wieder.

Tabelle 17: Fermentation mit ß-MDt unter Beobachtung der Makroelemente

Fermentationsdauer	24 Tage
pH-Verlauf	4,5 bis 5,0
Animpfmenge als Trockengewicht	1,53 g/l
Trockengewicht nach 20 Tagen	16,14 g/l
Glucoseverbrauch in 20 Tagen	50,2 g/l
Durchschnittlicher Glucoseverbrauch pro g Trockengewicht	3,11 g
Durchschnittlicher Glucosespiegel	0,38%
Frischzellvolumen nach 20 Tagen	70,0%
ß-MDt-Zugabemenge bis zum 18. Inkubationstag	556,88 g/l
Durchschnittlicher ß-MDt-Spiegel pro Tag in der Nährlösung	30,93 mg/l
ß-MDg nach 18 Inkubationstagen in der Nährlösung	462,02 mg/l
Wiederfindungsrate	82,9%

Abbildung 30 zeigt den Fermentationsverlauf. Der O_2-Partialdruck wurde mit eingezeichnet.
Tabelle 18 gibt den Ionenverbrauch bis zum Fermentationsende wieder.
Die Reihenfolge der Ionen steht gleichbedeutend für die Abnahme im Fermentermedium.
Natrium ist nicht mit aufgeführt, weil wegen einer neuen Caseincharge, die einen geringeren Na-Gehalt aufwies, kaum eine meßbare Abnahme festzustellen war.

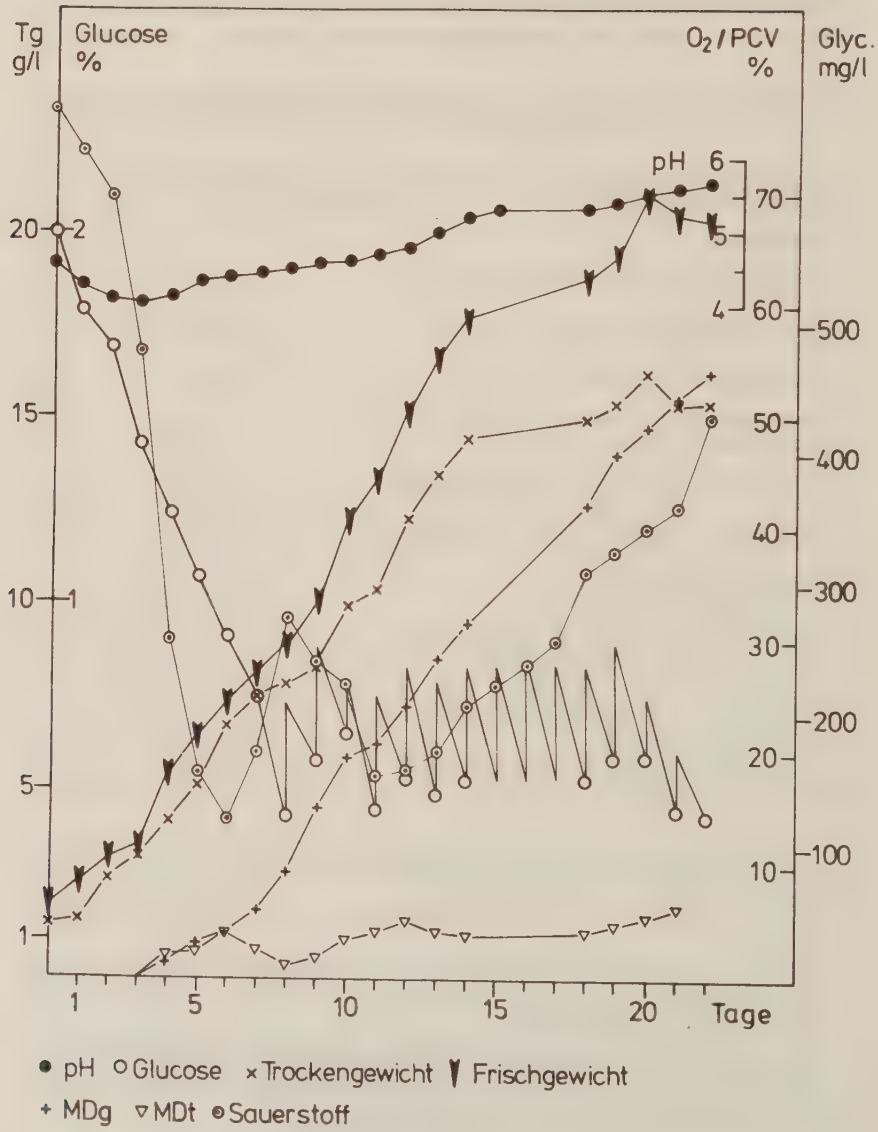


Abbildung 30: Fermentation mit ß-MDt-Inkubation bei Digitalis lanata unter Beobachtung der Makroelemente 24°C, ungeregelter Sauerstoffpartialdruck bei konstanten 350 NL Luft/h

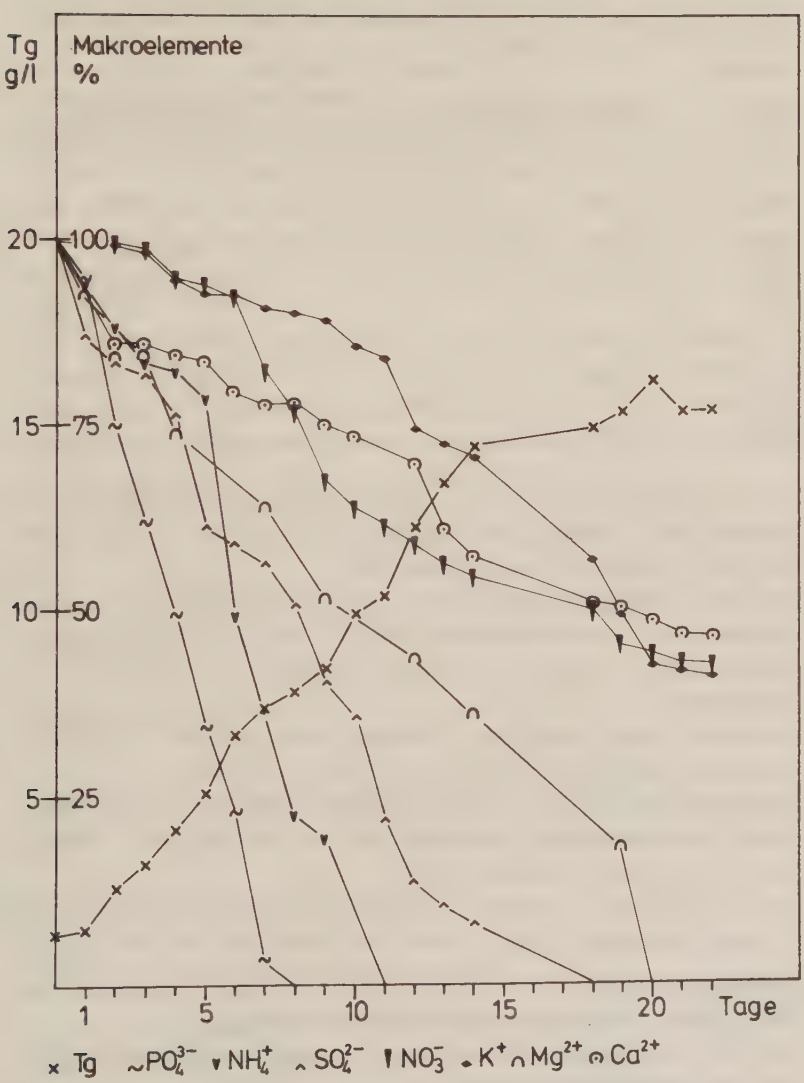


Abbildung 31: Abnahme der Makroelemente während einer Fermentation (20 l) mit kontinuierlicher ß-MDt-Zugabe, im Vergleich zum Anstieg des Trockengewichts

Tabelle 18: Anfangs- und Endgehalt der Makroelemente im MDt-Fermenter

Ion	Anfangsgehalt mg/l	Endgehalt mg/l
PO_4^{3-}	232	0 (8. Tag)
NH_4^+	357	0 (11. Tag)
SO_4^{2-}	102	0 (18. Tag)
Mg^{2+}	27	0 (20. Tag)
K^+	758	309
NO_3^-	2434	1136
Ca^{2+}	109	51

Auch unter MDt-Einfluß war die Reihenfolge der Abnahme, beginnend bei Phosphat über Ammonium und Sulfat vergleichbar wie beim reinen Wachstumsfermenter.
Der Nitratverbrauch war unter dem MDt-Einfluß stark gehemmt. Während beim Wachstumsfermenter 2327 mg/l Nitrat metabolisiert wurden, verbrauchte der MDt-Fermenter hier nur 1298 mg/l.
Hingegen zeigt Kalium mit 449 mg/l eine stärkere Abnahme, im Gegensatz zu 212 mg/l beim Fermenter ohne MDt.
Magnesium war am 20. Tag nicht mehr nachzuweisen, während beim vorangegangenen Fermenter am letzten Tag noch knapp die Hälfte vorhanden war.
Der Calciumgehalt verhielt sich bei beiden Fermentern gleich: er sank innerhalb von 20 Tagen auf etwa die Hälfte ab.

Abbildung 31 zeigt die Ionenabnahme bis zum Fermentationsende gegen das Trockengewicht aufgetragen an.
Aus der Ionenabnahme lassen sich keine Rückschlüsse auf die Hydroxylierung ablesen.
Der MDt-Umsatz stieg parallel zum Wachstum an.
Der Sauerstoffgehalt sank zu Beginn stark ab, von 78% am Animpftag bis auf 18% schon am 6. Tag. Bis zum 18. Tag pendelte er zwischen den Werten um 14% bis 30%, und stieg dann am Fermentationsende wieder auf 50% an. Dies korrelierte mit dem verlangsamten Zellwachstum.

10.4 Ionenbestimmung im 200 l-Fermenter mit ß-MDt-Zugabe

Auch beim Übertragen biologischer Prozeße vom 20 l-Fermenter zu einem 200 l-Fermenter, ist es das Ziel, die biologische Leistung der Zellen aufrechtzuerhalten.
Da man davon ausgeht, daß die Stoffwechselleistung der Zelle ursächlich mit den Bedingungen in ihrer Umgebung zusammenhängt, ist es notwendig, möglichst genau die Nährlösungszusammensetzung während dieses Fermentationsverlaufes zu bestimmen.
Ein 200 l-Stahlfermenter (pilot plant der Firma Chemap Company, Männedorf, Schweiz) wurde mit einem Leitungswasserstamm, der auf caseinfreiem Medium angezogen war, angeimpft. Um die enormen Herstellungskosten von bidestilliertem Wasser zu umgehen, wurde hier Leitungswasser verwendet. Vorversuche hierzu sind in Kapitel 11 beschrieben.
In Tabelle 19 und Abbildung 33 ist die Ionenabnahme zu sehen, und in Abbildung 32 sind das Wachstum, die ansteigende MDg-Produktion, das Trockengewicht und der Sauerstoffverbrauch dargestellt.

Tabelle 19: Verbrauch der Makroelemente im 200 l-Fermenter unter ß-MDt-Zugabe

Ion	Anfangsgehalt mg/l	Endgehalt mg/l
PO_4^{3-}	206	0 (8. Tag)
NH_4^+	366	0 (12. Tag)
SO_4^{2-}	166	0 (15. Tag)
Mg^{2+}	44	am 17. Tag nicht mehr nachweisbar
NO_3^-	2320	982
Ca^{2+}	120	69
K^+	725	488

Natrium konnte wegen der geringen Menge nicht bestimmt werden.

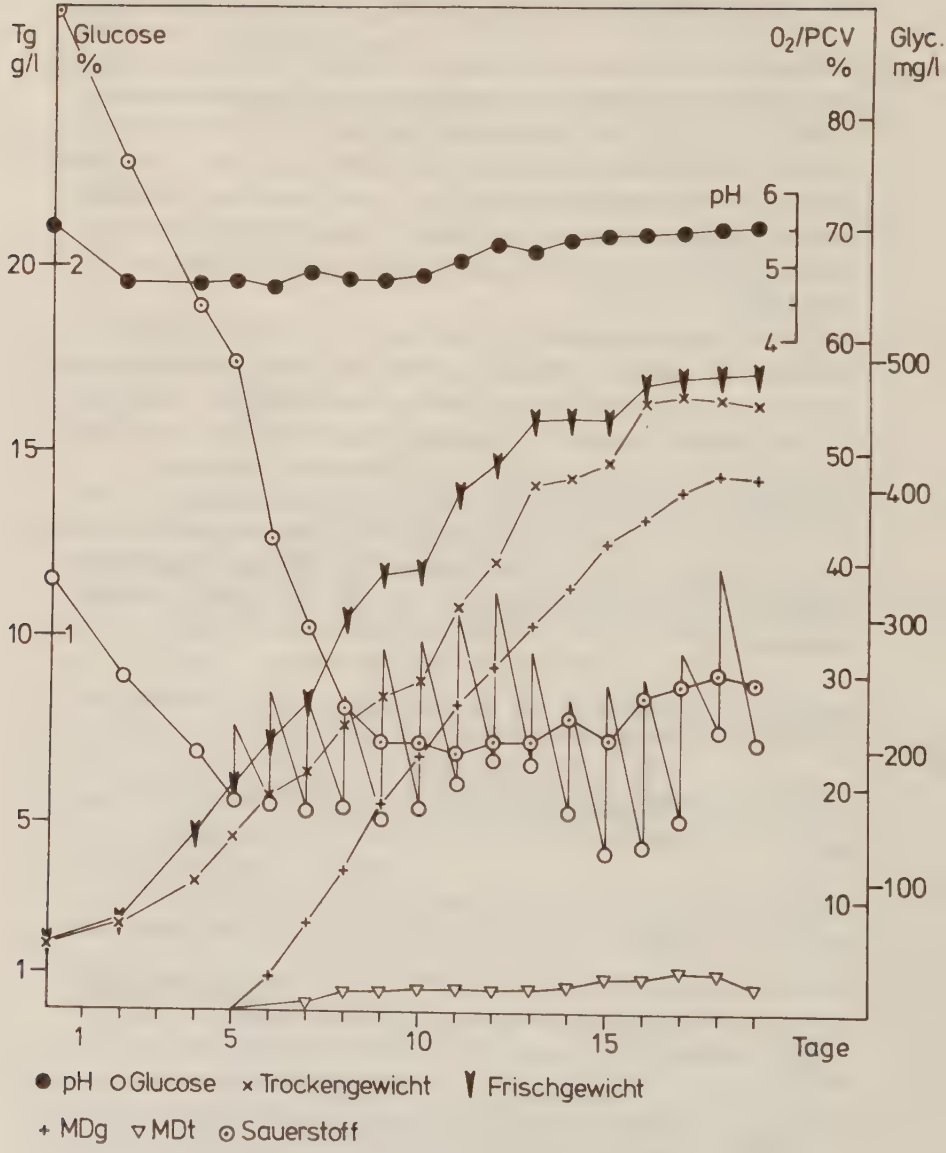


Abbildung 32: Fermentation von Digitalis lanata im 200 l-Bioreaktor unter kontinuierlicher ß-MDt-Zugabe, 24°C, nach 8 Tagen geregelte Sauerstoffzufuhr

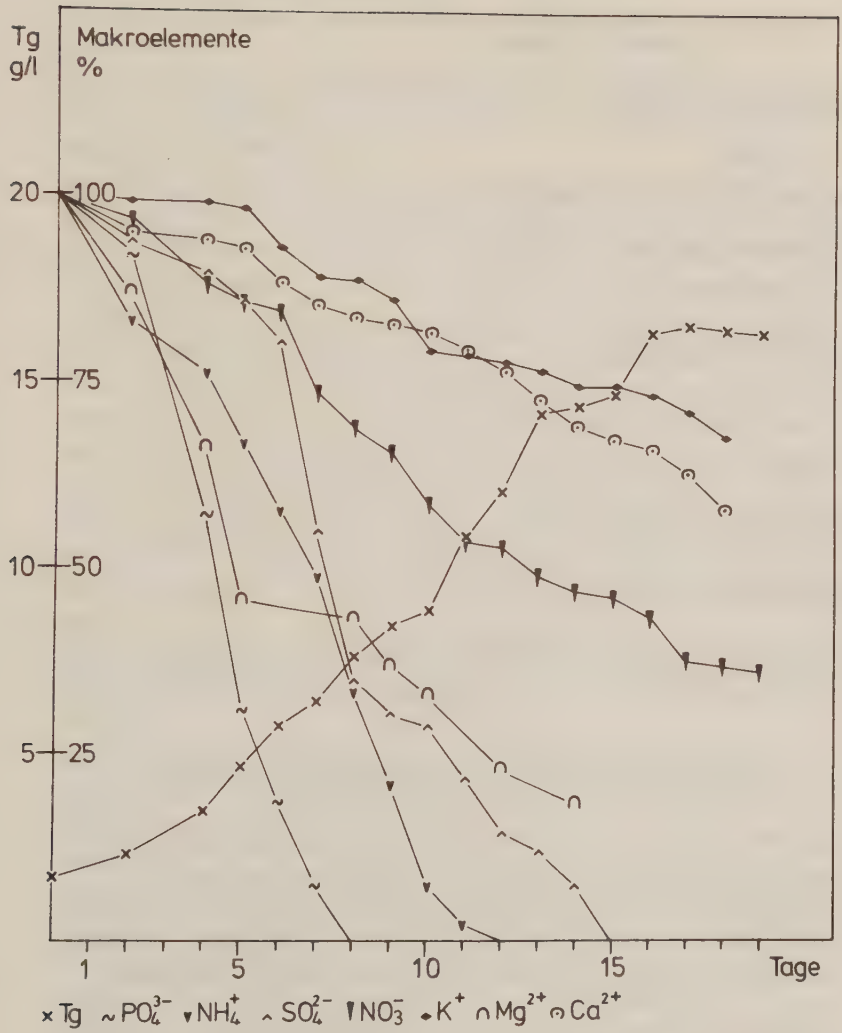


Abbildung 33: Verbrauch der Makroelemente im 200 l-Fermenter unter ß-MDt-Inkubation bei Digitalis lanata

Tabelle 20 zeigt die Fermentationsdaten des 200 l-Fermenters auf Leitungswasser ohne Casein.

Tabelle 20: Fermentation mit ß-MDt unter Beobachtung folgender Parameter

Fermentationsdauer	19 Tage
pH-Verlauf	5,54 bis 5,53
Animpfdichte als Trockengewicht	1,66 g/l
Trockengewicht nach 19 Tagen	16,4 g/l
Glucoseverbrauch in 19 Tagen	58,9 g/l
Durchschnittlicher Glucoseverbrauch pro g Trockengewicht	3,98 g
Durchschnittlicher Glucosespiegel in der Nachfütterungsphase	0,56%
Frischzellvolumen nach 19 Tagen	57,0%
ß-MDt-Zugabemenge bis zum 14. Inkubationstag	688,0 mg/l
Durchschnittlicher ß-MDt-Spiegel pro Tag in der Nährlösung	25,9 mg/l
ß-MDg-Menge nach 14 Inkubationstagen in der Nährlösung	409,26 mg/l

10.5 Ergebnisse des 200 l-Fermenters und Dikussion

Wenn man den Ammonium- und Nitratverbrauch bei allen Fermentationsverläufen vergleicht, sieht man, daß von der Stickstoffquelle zu Beginn immer erst Ammonium verbraucht wird, aber daß in den späteren Fermentationsphasen, sobald kein Ammonium mehr da ist, auch Nitrat stark assimiliert wird.

Herr D.Schwantag betreute die technische Anlage des Großfermenters, entnahm die Proben, stellte das Wachstum und und die MDt-Umsatzmenge fest.

Diese Ergebnisse gehen konform mit den Beobachtungen von ZINK und VELIKY (1977) bei Ipomoeazellen, und von OHIRA et al. (1976) bei Reiszellen.
Ammonium nimmt im Medium immer mit dem Anwachsen der Biomasse ab.
Auffällig ist die größere Abnahme von Nitrat und Sulfat im Medium ohne Casein (200 l-Fermenter), gegenüber dem Vollmedium im 20 l-Fermenter.
Da Nitrat und Sulfat in kultivierten Zellen größtenteils für die Proteinbiosynthese herangezogen werden, ist so die starke Abnahme dieser beiden Komponenten erklärbar (FILNER 1978).
Den Abfall des pH am Anfang der Fermentation im 20 l- und 200 l-Maßstab kann man mit dem schnellen Ammoniumverbrauch erklären, und den darauf folgenden pH-Anstieg mit der gleichzeitigen Absorption von Nitrat.
Wenn man die Leitfähigkeit und die Nitratabnahme vergleicht, zeigt sich, daß die Leitfähigkeit parallel zum Nitratverbrauch abfällt. Dies ist dadurch erklärbar, daß Nitrat das Ion mit der höchsten Konzentration im MS-Medium ist, und dadurch auch den stärksten Einfluß auf die Leitfähigkeit ausübt.
Schon HAHLBROCK (1975) stellte eine genaue Beziehung zwischen Abnahme der Leitfähigkeit, Nitratverbrauch und Wachstum auf.
Kalium wird verhältnismäßig wenig verbraucht. YOSHIDA und SEKIGUCHI (1972) vertreten die Hypothese, daß durch einen hohen Ammoniumgehalt die Kaliumaufnahme in die Zellen gehemmt ist.
Der Natriumgehalt im 200 l-Fermenter war nicht bestimmbar, da hier kein Casein zugesetzt wurde, was ja die Hauptquelle für den Natriumgehalt im Nährmedium ist, da Casein fabrikmäßig mit NaOH neutralisiert wird (Difco-Manual).
Die Sauerstoffversorgung beim Großfermenter lag zu Beginn bei 90% und sank innerhalb von 8 Tagen auf 27% ab. Im Unterschied zum 20 l-Fermenter mit ß-MDt, wurde hier ab dem 9. Tag der Sauerstoff-Partialdruck automatisch auf einen Wert um

26% geregelt. Im Vergleich zum ungeregelten 20 l-Fermenter zeigt ein, nach dem anfänglichen Abfall, für die restliche Fermentationsdauer konstant gehaltener Sauerstoffgehalt keinen Einfluß auf das Wachstum.
Vorhergehende Versuche von HELMBOLD (1979) brachten keine Erhöhung der Hydroxylierung bei Steigerung der Belüftungsrate von 350 NL Luft/h auf 700 NL Luft/h.
Abschließend läßt sich sagen, daß es für das scaling up, vom 1 l-Kolben auf den 200 l-Maßstab unbedingt erforderlich ist, auf jeder Stufe Informationen über den spezifischen Verbrauch einzelnen Ionen während des gesamten Fermentationsverlaufes zu gewinnen, um eine spätere Übertragung auf die kontinuierliche Fermentation zu ermöglichen.

11. Hydroxylation bei Zellkulturen auf unterschiedlichem Wasser

11.1 Bidestilliertes Wasser

Bisher wurden alle Versuche auf bidestilliertem Wasser durchgeführt. Es wäre zu erproben, inwieweit Mikroelemente aus Leitungswasser, die im Bidestillat fehlen, stimulierend auf Wachstum und Hydroxylierung wirken.

11.2 Bidestillat mit Zusatz von Leitungswassersalzen

Zunächst wurden die Salze des Leitungswassers (Bodenseewasser, Jahresmittelwerte 1980) und des MS-Mediums verglichen. Denn es sollte getestet werden, welchen Einfluß die durch das Leitungswasser zusätzlich eingebrachten Mikroelemente auf die Zellen haben.
Es wurden zunächst die mengenmäßig wichtigsten Mikroelemente ausgewählt, wie Strontium, Silicat, Barium, Lithium, Aluminium und Nickel. Die beiden letzten Metalle werden auch schon dem Nährmedium nach HELLER (1953) routinemäßig zugesetzt. Die gewählte Konzentration entsprach der des Leitungswassers.
In "B Material und Methoden" Abschnitt 3 sind die Konzentrationen der zugesetzten Salze aufgelistet.
Auf dem mit diesen Salzen angereicherten und zusätzlich mit 170 mg/l KH_2PO_4 versetzten Medium (LP-Medium) wurden 14 Wochen lang je zwei Versuchsansätze ohne ß-MDt-Zugabe, und je zwei mit 40 mg/l und 80 mg/l ß-MDt auf folgende Parameter untersucht: Frischzellzuwachs, Glucoseverbrauch, pH, Leitfähigkeit und zusätzlich auf die Osmolarität.
Auch der Umsatz von ß-MDt zu ß-MDg wurde nach jeder Passage gemessen und in Abbildung 34 dargestellt.

11.3 Versuche auf Leitungswasser mit und ohne Casein

Die gleichen Versuche wurden auch mit Leitungswasser, in dem die MS-Salze, Zucker, Hormone und Casein gelöst waren, durchgeführt (PLW-Medium)
Die Hydroxylierung wurde hier nur in größeren Abständen überprüft.
Im Unterschied zum Versuch mit bidestilliertem Wasser wurden die Zellaggregate, bei der Kultur auf Leitungswasser, im Laufe der Kultivierungszeit etwas größer.
Der pH lag beim Leitungswasserversuch immer höher als pH 5.
Wie auch beim LP-Medium war hier immer eine vollständige Umsetzung von 40 mg/l ß-MDt zu ß-MDg zu verzeichnen.
Das Frischzellvolumen lag leicht höher als beim bidestilliertem Medium und dem LP-Medium. Das PCV alleine vermag aber über das Wachstum nur annähernd etwas aussagen, weil beim Leitungswasserversuch die Partikel gröber waren. beim Absetzvolumen auch größere Zwischenräume ließen.
Beim Medium ohne Casein auf Leitungswasser (oCPLW) stieg der pH weiter bis zwischen 5,5 und 6.
Die Leitfähigkeit pendelte nach jeder Passage um 3000 µS/cm.
Die Zellen wuchsen auf dem oCPLW-Medium gut. Das Frischzellvolumen lag bei 40% bis 50% PCV. In größeren Abständen wurde die Hydroxylierung mit 40 mg/l ß-MDt getestet. Das zugesetzte MDt wurde immer vollständig umgesetzt.
Wie schon beim Vollmedium auf Leitungswasser, zeigten sich auch hier größere Zellkonglomerate. Dagegen war die Suspension im Vollmedium mit bidestilliertem Wasser sehr fein.
Ein Vergleich der Leitfähigkeit und der Osmolarität sowie des Frischzellvolumens aus diesen Versuchen zeigt Tabelle 21.

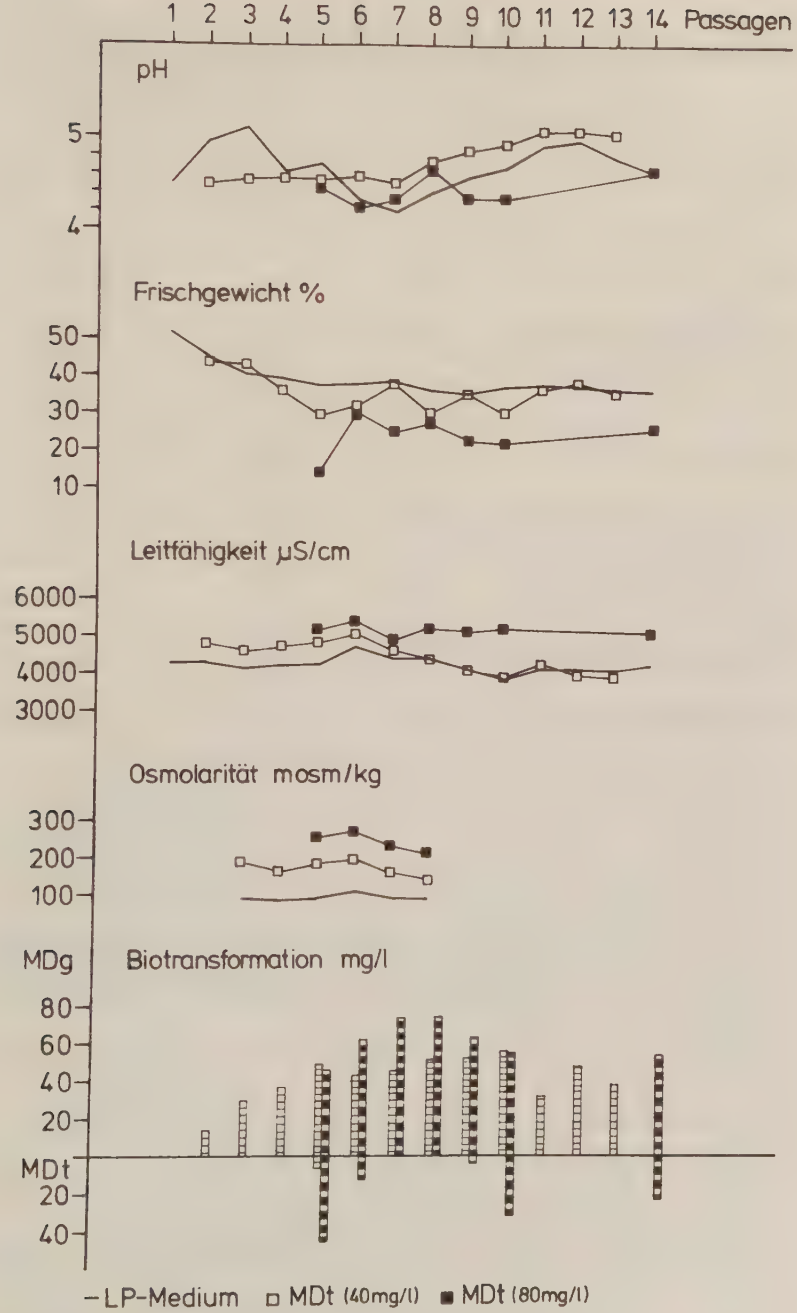


Abbildung 34: Kultivierung von Digitalis lanata auf MS-Medium mit Zusatz von Leitungswassersalzen und ß-MDt-Zugabe

Tabelle 21: Mittelwerte der Leitfähigkeit, der Osmolarität und des Frischzellvolumens beim MS-Medium mit verschiedenen Zusätzen an Wasser, Salzen, mit und ohne Casein. In der Klammer: Wert nach einer Passage

Medium	Leitfähigk. µS/cm	Osmolarität mosm/kg	PCV %
MS auf bidestilliertem Wasser	6010 (4290)	210 (83)	(39)
MS auf bidest. Wasser mit LW-Salzen (LP-Med.)	6120 (4750)	233 (110)	(38)
- mit 40 mg/l ß-MDt	6110 (5060)	246 (195)	(35)
- mit 80 mg/l ß-MDt	6130 (5470)	270 (243)	(25)
MS auf Leitungswasser (PLW-Medium)	6260 (3510)	249 (125)	(42)
MS ohne Casein auf bidest. Wasser (oCP-Med.)	5500 (3730)	155 (63)	(40)
MS ohne Casein mit Leitungswasser (oCPLW-Med.)	5820 (3100)	174 (50)	(45)
Leitungswasser (LW)	300	18	

Eindeutig ist die Parallelität der Leitfähigkeit mit der Osmolarität zu sehen, wie auch bildlich in Abbildung 34 zu erkennen ist. Beide Werte nahmen im Verlauf der Passagen und der Fermenterverläufe zusammen mit dem Verbrauch des Nährmediums kontinuierlich ab.

Die Osmolarität beinhaltet organische und anorganische Ionen und Zucker, die Leitfähigkeit wird nur durch die dissoziierten Ionen beeinflußt.

Während einer Passage auf LP-Medium nahm die Osmolarität von 233 auf 110 mosm/kg ab, bei Zusatz von 40 mg/l ß-MDt von 246 auf 195 mosm/kg und bei Zusatz von 80 mg/l ß-MDt ging die Osmolarität von 270 auf 243 mosm/kg zurück.

Von dem etwas höheren Ausgangswert des Mediums auf Leitungswasser nahm der osmotische Druck gleichermaßen ab.

Das Gleiche gilt für die oCP- und oCPLW-Medien. Nur lag dort

von Anfang an die Osmolarität schon niedriger, weil Casein im Medium fehlte.
An der Abnahme der Osmolarität, wie auch der Leitfähigkeit, kann man den Ionenverbrauch und das damit verbundene Wachstum ablesen.

11.4 Diskussion

Im Wachstum und der Hydroxylierung zeigten sich keine gravierenden Unterschiede, ob man bidestilliertes Wasser, bidestilliertes Wasser angereichert mit Leitungswassersalzen, oder Leitungswasser zum Lösen der MS-Salze nahm.
Auch ZENK brachte 1978 a schon Leitungswasser als Vorschlag zur Kostendämpfung ins Gespräch.
Problematisch ist nur, daß man mit gewissen Schwankungen in der Mineralsalzzusammensetzung des Leitungswassers rechnen muß.
Sofern man aber toxische Bestandteile durch Vorversuche ausschließen kann, ist Leitungswasser wegen der geringeren Kosten bidestilliertem Wasser vorzuziehen.
Für kleine Mengen fällt die damit erreichte Kosteneinsparung zwar nicht ins Gewicht, aber bei den angestrebten Versuchen mit Fermentern im 200 l-Maßstab und mehr, ist der Vorteil außer Frage.
Die Langzeithaltung der Kulturen ohne Casein bringen zwar enorme Einsparungen, zumal man dazu ja auch noch Leitungswasser statt des bidestillierten Wassers nehmen kann, bergen allerdings die Gefahr, wie schon in Kapitel 8 beobachtet, daß daraus ein Verlust der Hydroxylierung resultieren kann.

12. Abhängigkeit der Hydroxylierung und der Lebensdauer von Mediumsbestandteilen im Langzeitversuch

Wenn man eine bessere Ausnutzung der Pflanzenzellen im Fermenter erreichen will, müßte man sie länger am Leben erhalten, wobei vorausgesetzt wird, daß sie dann auch länger hydroxylieren würden.
Da bei unterschiedlichem Verdünnungsgrad des Mediums, bedingt durch den Nährstoffverbrauch, der physiologische Zustand der Zellen auch verändert wird, ergibt sich hier ein Ansatzpunkt, den Zustand der Zellen positiv im Hinblick auf vollständige Nährstoffversorgung zu beeinflußen, wenn man der Kultur das zugibt, was hauptsächlich verbraucht wird.
Das Wachstum und die Vermehrung der Zellen, ist begrenzt durch die limitierte Verfügbarkeit von Nährstoffen (vorausgesetzt die Zellen nutzen das Medium optimal aus).
HELMBOLD (1979) begann Versuche in diese Richtung mit der Zugabe von Vollmedium während der Fermentation, um ein frühes Absterben der Kultur hinauszuzögern, was aber keinen sichtbaren Erfolg brachte.
Da nie alle Komponenten gleichermaßen schnell konsumiert werden, erscheint es sinnvoll, je nach Bedarf, nur die verbrauchten Ionen zuzugeben.
Das Ziel lag im Hinblick auf kontinuierliche Fermentation bei:

- langer Lebensdauer
- optimalem Nährstoffangebot durch Zugabe fehlender Nahrungselemente, dadurch
- langanhaltender Hydroxylierung
- eventueller Stimulation der Hydroxylase durch anorganische Ionen
- Studium der Abhängigkeit der Hydroxylierung von der Ionenkonzentration

12.1 Zugabe von Phosphat / Ammonium / Glucose

Phosphat und Ammonium sind die ersten Ionen, die aus dem

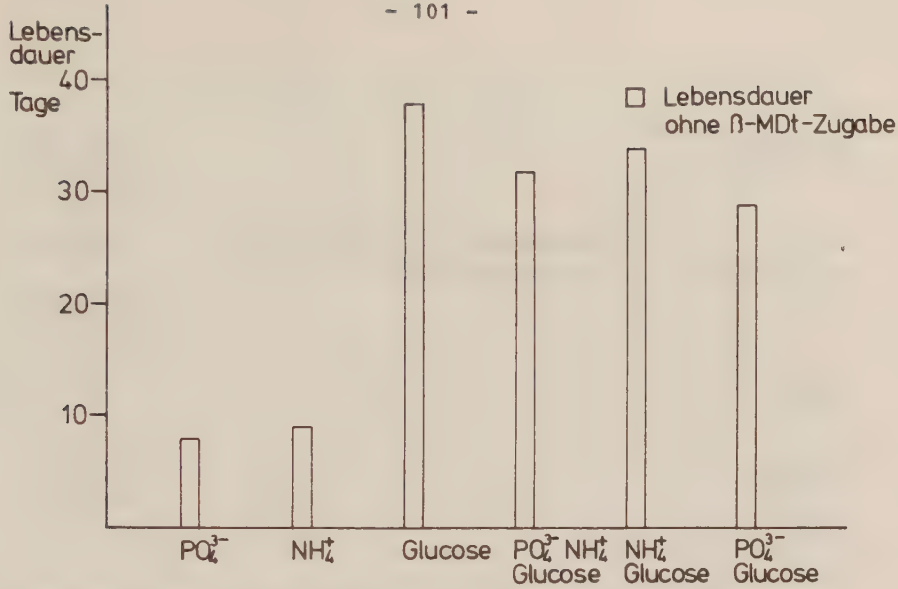


Abbildung 35: Lebensdauer in Tagen unter Nachfütterung von Phosphat, Ammonium und Glucose (1 l-Kolben)

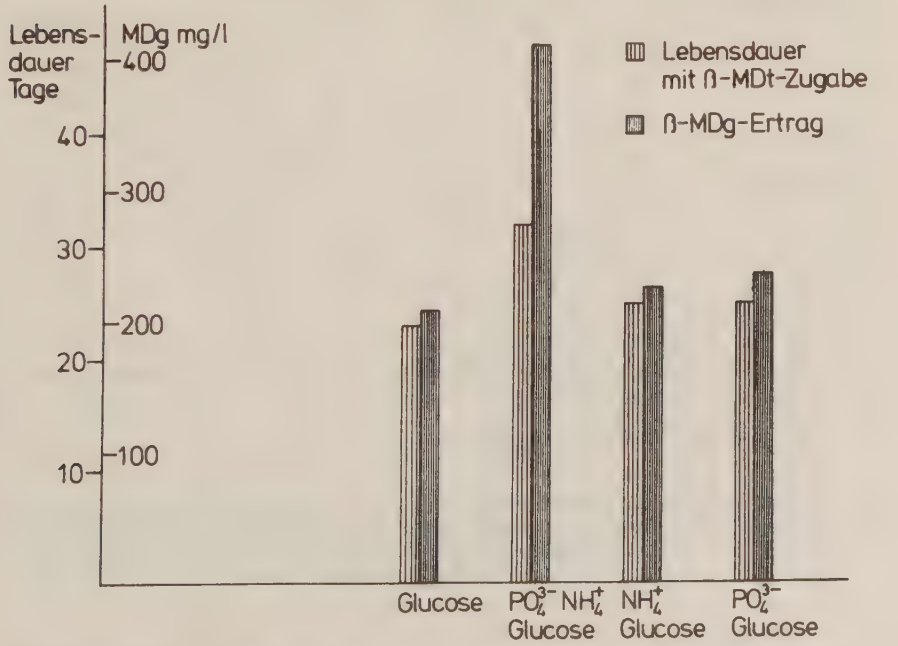


Abbildung 36: ß-MDg-Ertrag und Lebensdauer in Tagen bei MDt-Zugabe unter Nachfütterung von Ammonium, Phosphat und Glucose in Suspensionskulturen von Digitalis

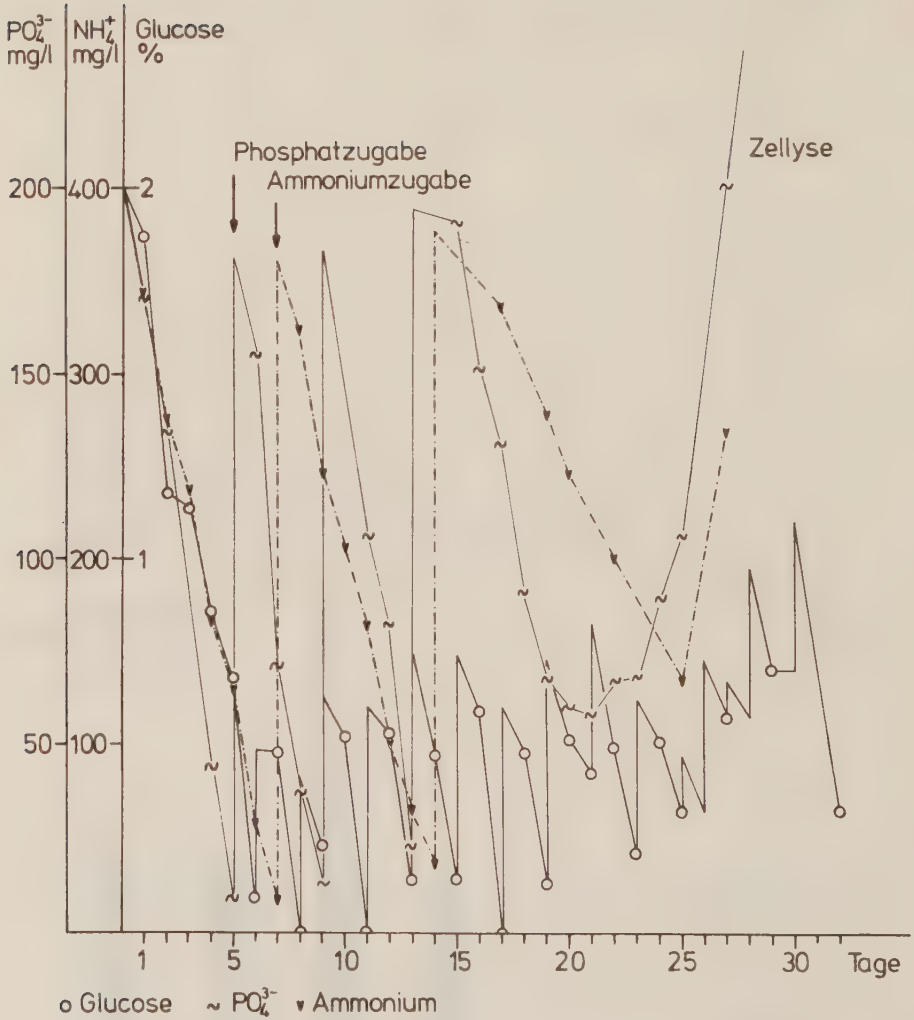


Abbildung 37: Kultivierung von Digitalis lanata Zellsuspension unter mehrmaliger Nachfütterung von Ammonium und Phosphat und Glucose im 1 l-Erlenmeyerkolben

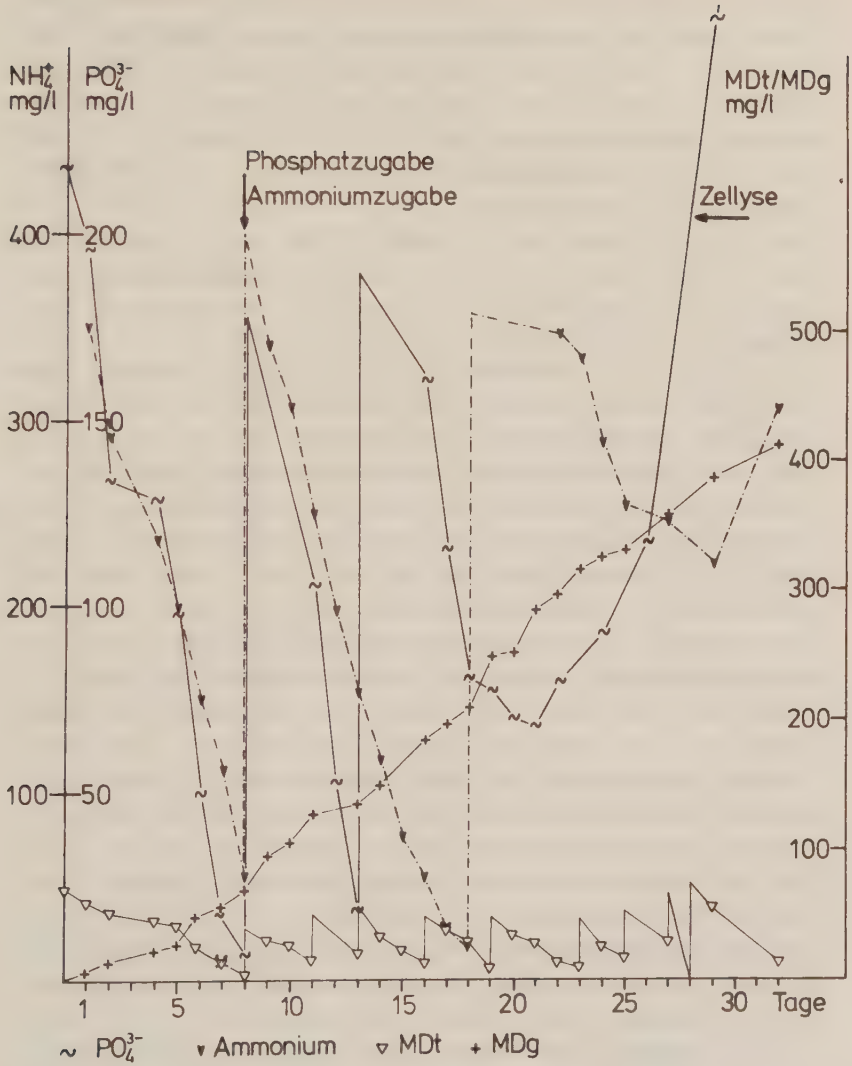


Abbildung 38: Hydroxylierung von Digitalis lanata Zellsuspension unter Nachfütterung von NH_4^+/PO_4^{3-} und Glucose im 1 l-Erlenmeyerkolben

Medium in die Zellen aufgenommen werden. Wie verändert sich die Kultur; was für Auswirkungen auf die Biotransformation zeigt die ständige Nachfütterung dieser Ionen in diesem Versuch.
Bei der täglichen Probenahme aus 1 l-Kolben mit 300 ml Medium und 30 g Zellmaterial wurde der Verbrauch an Phospaht, Ammonium und Glucose überprüft.
Nach fast vollständigem Verbrauch dieser anorganischen Ionen, wurde durch Zugabe der entsprechenden Salzmenge, in zwei ml destilliertem Wasser, die ursprüngliche Konzentration des MS-Mediums wiederhergestellt.
Das wurde so oft wiederholt, bis ein Ansteigen des Phosphat- oder Ammonium-Spiegels die Zellyse anzeigte. Der Tag vorher wurde als letzter Lebenstag gerechnet.
Der steile Anstieg der Phosphatkonzentration im Medium war immer ein erster Anzeiger für Zellyse, schon bevor eine sichtbare Veränderung der Zellkultur darauf hinweist.
Erst 2 bis 3 Tage später war dann auch ein Anstieg der Ammoniumkonzentration nachzuweisen.
Die Tatsache, daß am Ende des Versuches nie mehr so viel Ammonium gefunden wurde, als zugegeben worden war, deutet darauf hin, daß es in erheblichen Umfang metabolisiert wurde.
Phosphat wurde nur in geringer Menge verbraucht, sodaß es bei der Zellyse wieder in hoher Konzentration als anorganisches Phosphat auffindbar war.
Bei der Glucosezugabe wurde darauf geachtet, daß der Gehalt nie ganz auf Null absank.
Bei den Versuchsansätzen, die zusätzlich Methyldigitoxin bekamen, wurde der Umsatz zu MDg gemessen, und bei tiefem Substratspiegel wurde erneut ß-MDt zugegeben.
In der Abbildung 35 ist die Lebensdauer abhängig von dem Nachfütterungselement angegeben.
Glucose wurde bei allen folgenden Langzeitversuchen nachgefüttert, weil sonst die Zellen sehr schnell abstarben.
Auf der Abbildung 36 wurde die Menge an umgesetztem ß-MDg neben die Lebensdauer aufgetragen.

Der zeitliche Verlauf des Phosphat- und Ammoniumverbrauchs, sowie der Nachfütterung wird in Abbildung 37 und mit ß-MDt-Inkubation in Abbildung 38 gezeigt.
Die reine Glucosenachfütterung ohne Ionenzuführung und der schnelle Verbrauch von NH_4^+ und PO_4^{3-} in den ersten Tagen der Langzeitkultur wurde in Abbildung 39 dargestellt, der gleiche Versuch unter ß-MDt-Zusatz ist in Abbildung 40 zu sehen.

12.1.1 Ergebnisse

Ohne Glucosenachfütterung waren die Versuche bedingt durch Zellyse schon nach 8 bis 9 Tagen zu Ende.
Bei ausschließlicher Glucosenachfütterung war die Kultur 38 Tage am Leben zu halten, obwohl am 5. Tag kein Phosphat, und am 8. Tag kein Ammonium mehr nachzuweisen war (Abb. 39). Der langsamere PO_4^{3-}/NH_4^+ -Verbrauch und die kürzere Lebensdauer unter ß-MDt-Einfluß ist im Vergleich dazu in Abb. 40 zu sehen. Dort ist erst am 7. Tag kein Phosphat und am 9. Tag kein Ammonium mehr detektierbar. Auch mußte der Versuch 15 Tage früher wegen Zelltod beendet werden.
Allein schon die Nachfütterung von Ammonium erniedrigte die Lebensdauer gegenüber der reinen Glucosenachfütterung um 4 Tage und wenn Phosphat nachgegeben wurde, ging sie um weitere 5 Tage auf 29 Tage zurück. Allerdings verbesserte sich die Erhaltungszeit wieder um 3 Tage, wenn Ammonium in Kombination mit Phosphat nachgefüttert wurde (Abb. 35).
Bei der kombinierten Nachfütterung von Ammonium, Phosphat und Glucose wurden insgesamt zu der Ausgangsmenge von 340 mg/l KH_2PO_4 noch 510 mg/l KH_2PO_4 (3 Zugaben) zugefüttert und zu den 1650 mg/l Ammoniumnitrat noch 2mal die gleiche Menge (Abb. 37).
Bei den Parallelversuchen mit ß-MDt-Zusatz wurde NH_4^+/PO_4^{3-} weniger stark verbraucht, und es mußte nur 2mal Phosphat und auch nur 2mal Ammonium nachgegeben werden (Abb. 38).
Die Hydroxylierung steigerte sich in der folgenden Reihenfolge der Zugabe: Glucose, Ammonium, Phosphat und war dann mit der Kombination von allen dreien am besten und lag bei

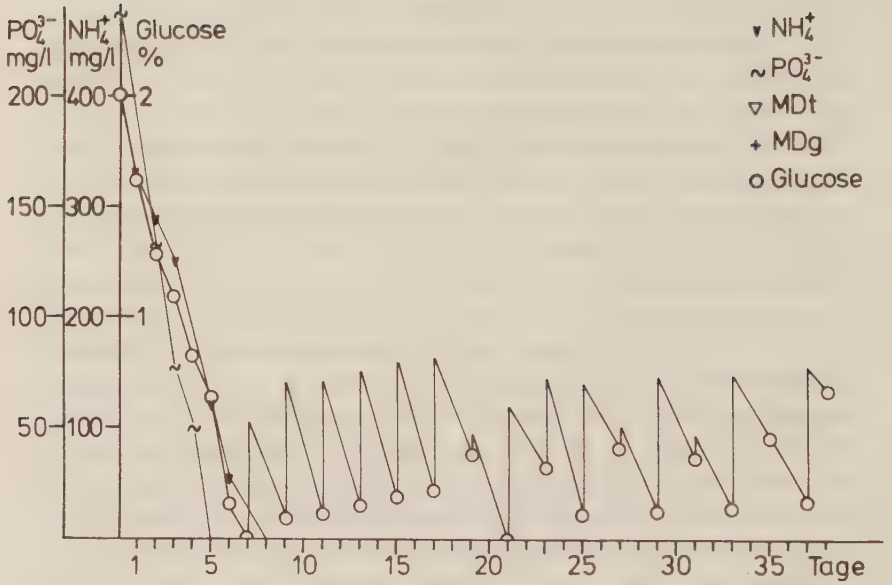


Abbildung 39: Kultivierung von Digitalis lanata Suspensionskultur unter Glucosenachfütterung im 1 l-Kolben

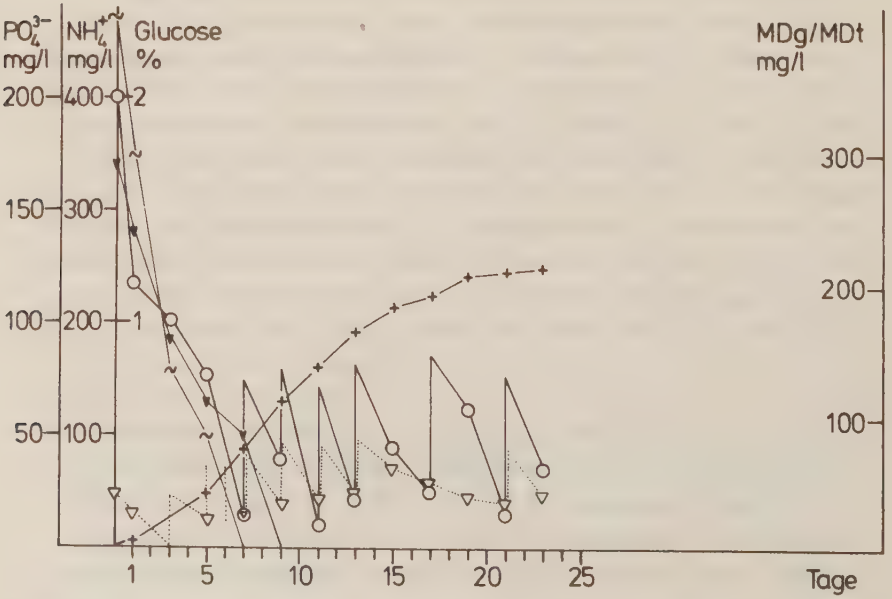


Abbildung 40: Hydroxylierung unter Glucosenachfütterung einer Suspensionskultur von Digitalis lanata (1 l-Kolben)

412 mg/l ß-MDg (Abb. 36). Das war um 200 mg/l besser, als bei dem Versuch mit reiner Glucosenachfütterung.

12.2 Zugabe von Mediumsbestandteilen

Mit der Zugabe von Phosphat und Ammonium allein sind aber die Bestandteile des MS-Mediums im Hinblick auf Nachfütterung noch nicht voll ausgeschöpft.
Das MS-Medium wurde nun in seine Hauptbestandteile zerlegt, wie es in Tabelle 22 aufgeführt ist.
Jeder Block bedeutet ein Versuchsansatz mit der Zugabe von jeweils einem oder mehreren Hauptbestandteilen des MS-Mediums.

Tabelle 22: Einteilung des Vollmediums in seine Hauptbestandteile

Vollmedium	Vollm. o.C.	Casein	Mikroelem.	Makroelem.
Makro-elemente	Makro-elemente			Makro-elemente
Mikro-elemente Vitamine Hormine	Mikro-elemente Vitamine Hormone		Mikro-elemente Vitamine Hormone	
Casein		Casein		

Falls eine dieser Komponenten, oder ein Teil davon, der wachstumslimitierende Faktor wäre, müßte die Zugabe eines der Blöcke eine Änderung der Wachstumsraten, und eventuell der Hydroxylierung bedingen. Es wurde versucht, durch Bereitstellung der für die Biosynthese notwendigen Bausteine, eine Aktivierung oder Neubildung der hydroxylierenden Enzyme zu erreichen.
Zu je zwei Kolben mit 300 ml Medium und 30 g Frischgewicht an Digitaliszellen, wurden nach der 1. Woche täglich 2 ml sterilfiltrierte Mediumsbestandteile in den Konzentrationen des MS-Mediums zugegeben. Zur Lebenserhaltung wurde je nach Bedarf 40%ige Glucoselösung zugefüttert.

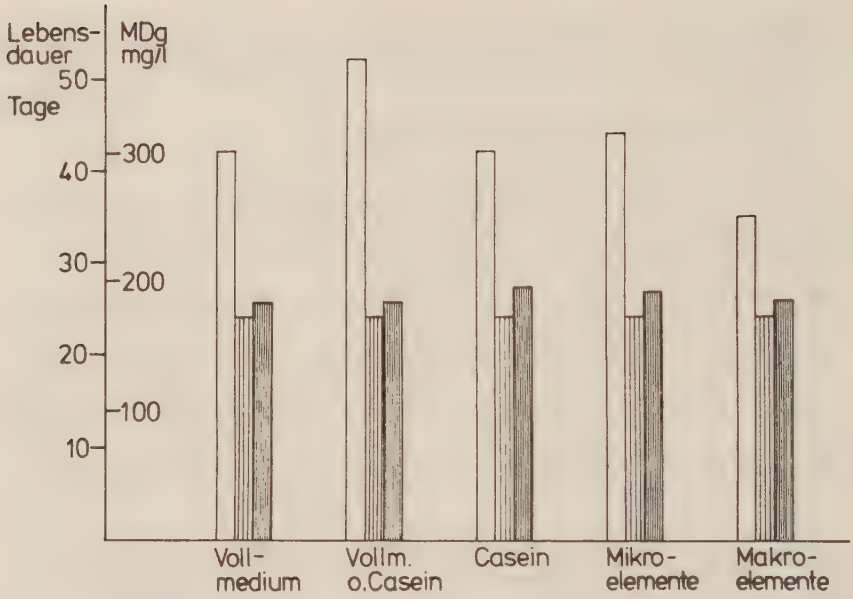


Abbildung 41: Lebensdauer und Biotransformationsertrag unter Nachfütterung von Mediumsbestandteile

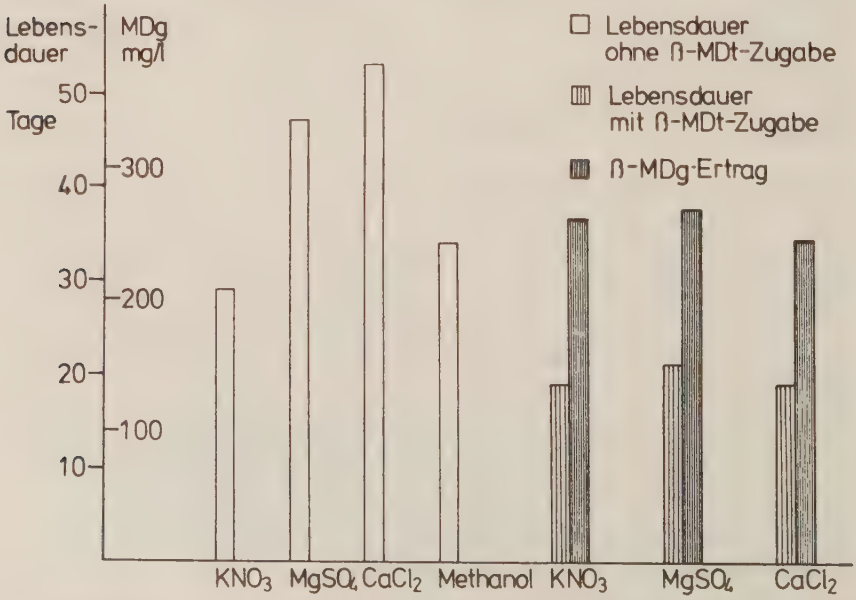


Abbildung 42: Lebensdauer und MDg-Ertrag unter Nachfütterung von Makrosalzen mit und ohne MDt-Zugabe im 1 l-Kolben

Weiterhin wurden je zwei Ansätze mit 40 mg/l ß-MDt versetzt. Sobald der Substratspiegel auf ca. 10 mg/l MDt sank, wurde erneut Methyldigitoxin zugegeben.
Aus Abbildung 41 ist die Erhaltungszeit ohne MDt und mit MDt, in Abhängigkeit des Nachfütterungsbestandteiles zu ersehen. Auch wurde der erreichte ß-MDg-Spiegel mit eingezeichnet.

Die Auswertung der Abbildung zeigt eine überraschende Ähnlichkeit der MDg-Produktion in den verschiedenen Versuchsreihen.
Keiner der Zusätze erbrachte eine Steigerung der 12 ß-Hydroxylierung.
Bei der Länge der Lebensdauer zeigen sich allerdings Unterschiede: sie lag zwischen 35 Tagen bei Zufütterung der Makroelememente und 52 Tagen bei Zufütterung von Vollmedium mit Casein.
Bei Supplementierung allein mit Vollmedium bzw. Casein oder den Makrosalzen überdauerte die Kultur einheitlich 42 bis 44 Tage.

12.3 Zugabe von $MgSO_4$, $CaCl_2$, KNO_3

Diese drei Salze, Bestandteile der Makroelemente, nehmen wesentlich langsamer beim Wachstum einer Kultur ab, als KH_2PO_4 und NH_4NO_3 (Kapitel 10).
Es sollte nun getestet werden, ob die Zufuhr eines dieser Salze einen Einfluß auf die Zellkultur zeigen würde.
Da bei der geringen Probenahme von 4 ml keine Verbrauchsmessung der drei betrachteten Salze ($MgSO_4$, $CaCl_2$, KNO_3) möglich war, wurden jeden zweiten Tag 10% der Ausgangskonzentrationen dieser Salze zum MS-Medium zugegeben.
Parallel dazu bekamen je zwei Versuchsansätze zusätzlich ß-MDt.
Ein Vergleichsansatz mit Zugabe von 80%igem Methanol im Rhythmus der MDt-Substitution diente dazu, die Auswirkungen des Methanols auf die Zellen zu zeigen.
Die Ergebnisse der beschriebenen Versuchsreihen bezüglich Lebensdauer und gegebenfalls MDt-Umsatz sind in Abbildung

42 dargestellt.

Die Lebensdauer stieg von 29 Tagen mit Zufütterung von Kaliumnitrat, über 47 Tage mit $MgSO_4$, bis zu 53 Tagen bei Zufütterung von $CaCl_2$, was insgesamt einen Unterschied von 24 Tagen ausmacht.
Die geringe Lebenszeit der Kaliumnitratkulturen, die schon nach 29 Tagen lysierten, läßt auf eine toxische Akkumulation von KNO_3 schließen.
Bei Zufuhr von MDt unter Ionennachfütterung sank allgemein die Lebensdauer, was auf den Einfluß des MDt und des Methanols zurückzuführen ist.
Die Biotransformationsergebnisse lagen im Durchschnitt bei 259 mg/l MDg, und zeigten keine große Differenz untereinander.

12.4 Ergebnisse und Diskussion

Bemerkenswert ist die beim Versuch 12.2 erhaltene wesentlich längere Lebensdauer von 42 bis 52 Tagen beim Nachfüttern von Mediumsbestandteilen (außer bei den Makroelementen mit nur 35 Tagen).
Das Ziel der langen Kulturerhaltung wurde nur mit dem Vollmedium ohne Casein mit 52 Tagen und mit $CaCl_2$ mit 53 Tagen erreicht.
Die Biotransformation ist aber leider nicht daran gekoppelt. Die Methanolzugabe allein verringerte schon die Lebensdauer der Zellen um 4 Tage gegenüber der Kultur ohne Methanol, die 38 Tage überdauerte (Abb. 35 und Abb. 42). Aber mit MDt sank die Erhaltungszeit der Kultur um 11 auf nur 23 Tage, bis die Zellen braun wurden und abstarben (Abb. 36).
Ein möglicher Ansatzpunkt wäre hier die Suche nach einem Lösungsmittel, in dem sich MDt löst, das aber doch nicht toxisch auf die Zellen einwirkt.
Bei der Biotransformation unter ß-MDt-Nachfütterung zeigten Casein, Makro- und Mikroelemente sowie die Vollmediumsbestandteile keinen Unterschied. Das Ergebnis lag bei 183 mg/l bis 197 mg/l MDg, und die Lebensdauer erreichte dabei nur

24 Tage.
Etwas besser im Umsatz schnitten die Salze $MgSO_4$, $CaCl_2$ und KNO_3 ab. Bei ihrer Zugabe wurden 247 mg/l bis 269 mg/l MDg erzielt.
Keines dieser Elemente scheint also die Hydroxylierung zu verbessern.
Bemerkenswert aber ist, daß nur bei der Kombination von Ammoniumnitrat-, Kaliumphosphat- und Glucose-Nachfütterung eine bedeutende Steigerung der Hydroxylierung gelang, von 210 mg/l MDg bei der reinen Glucosezugabe, auf 412 mg/l MDg bei der Ionenkombination. Diese Höhe wurde sonst bei keinem anderen Zufütterungsbestandteil erreicht.
Gegenüber der Vollmediumnachfütterung bedeutet die Reduktion auf zwei Salze bei der Langzeiterhaltung für die Hydroxylierung einen großen Fortschritt.
Es scheint wert zu sein, die Einflüsse des Mediums noch weiter zu untersuchen, um noch mehr Informationen darüber zu erhalten, welche Nahrungsstoffe für die Biotransformation wirklich essentiell sind; denn die Mediumszusammensetzung scheint noch weit von einer optimalen Anpassung an die Bedürfnisse der Kultur, und damit von dem Ziel der Ausschöpfung der Leistungsfähigkeit der Zellen bezüglich Wachstum und Hydroxylierung entfernt zu sein.

13. Medien mit verschiedenen anorganischen Stickstoffquellen

Obwohl Pflanzenzellen Stickstoff in verschiedener Form aufnehmen können, sind die Hauptquellen unter natürlichen Bedingungen Nitrat- und Ammoniumionen.
Im N-Stoffwechsel der Pflanze spielt Ammonium (NH_4^+) eine besondere Rolle. Es ist die einzige anorganische Stickstoffverbindung, die direkt organisch gebunden werden kann.
Nitrat (NO_3^-), neben NH_4^+ die wichtigste anorganische N-Quelle, muß zunächst zu Ammonium reduziert werden.
Bei der Nitratreduktion wird NO_3^- durch die Enzyme Nitratreduktase und Nitritreduktase, mit NO_2^- als einzigem freien Zwischenprodukt, zu NH_4^+ umgesetzt.
Da Ammoniak schon in niedrigen Konzentrationen ein starkes Zellgift ist, wird es deshalb schnell in organische Bindungen übergeführt, vor allem durch die Synthese von Glutamat und Glutamin (HARTMANN 1982).
Die physiologische Antwort der Zellen auf diese Ionen ist jedoch sehr unterschiedlich, und die Fähigkeit der Pflanzen, diese zu absorbieren und/oder zu metabolisieren, variiert stark (LEWIS 1982).
Das Füttern der Digitaliszellen mit unterschiedlichen Mischungen von NH_4^+/NO_3^- könnte sowohl das Wachstum, als auch die Hydroxylierung beeinflußen.
Der Unterschied des MS-Mediums zu anderen herkömmlichen Meddien besteht in einem hohen Gehalt an Nitrat-Ionen, die den Pflanzenzellen als NH_4NO_3 und als KNO_3 angeboten werden.
Welches dieser Bestandteile wird nun bevorzugt?
Im folgenden, wurden Versuche mit 20 mmol KNO_3 ohne Ammoniumnitrat im Medium, bzw. mit 20 mmol NH_4NO_3 ohne KNO_3, durchgeführt. Weiterhin wurde getestet, ob durch die jeweils doppelte Salzkonzentration eventuell ein Ausgleich für den Mangel des anderen Salzes geschaffen werden konnte.

13.1 MS-Medium mit 20 mmol und 40 mmol NO_3-N als KNO_3

In diesem Medium fehlt Ammonium, welches, wie in früheren

Versuchen nachgewiesen, im N-Stoffwechsel bevorzugt von den Zellen aufgenommen wird (Kapitel 10).
In der ersten Woche wurden die vorher an MS-Vollmedium gewöhnten Kulturen, auf ein in allen Salzen gleichgebliebenes MS-Medium gesetzt, bei dem nur NH_4NO_3 fehlte. Stickstoff wurde in einer Konzentration von 20 mmol KNO_3 (K-Medium) bzw. 40 mmol KNO_3 (K x 2-Medium) zugeführt.
Abbildung 43 zeigt die gewonnenen Daten bis zur 18. Woche bei beiden K-Medien.
Zu Beginn der Gewöhnung färbten sich die Zellen braun, und der Überstand war von ausgeschiedenen Phenolen rötlich.
Die Kulturen mit 40 mmol KNO_3 waren noch dunkler als die mit nur 20 mmol KNO_3.
In der 8. Woche bildeten sich grobe Zellaggregate mit einer Mischung aus braunen und hellen Zellen, die sich beim Umimpfen gut separieren ließen.
In der 10. Woche war der Überstand zwar noch leicht rosa, aber es waren unter mäßigem Wachstum schon wesentlich mehr hellgelbe Zellhaufen gebildet worden.
Am Ende der 14. Woche waren die Kaliumnitratzellen elfenbeinfarben und der Überstand farblos.
Bei der Kultur mit 20 mmol KNO_3 lag der pH nach einer anfänglichen Adaptionszeit um pH 6,4 bis 6,6 und bei der Kultur mit 40 mmol KNO_3 mit pH 6,2 bis 6,4 etwas darunter.
Beim Frischzellvolumen wirkte sich der Übergang vom Vollmedium auf das Ammoniummangelmedium in einer deutlichen Senkung aus. Sowohl bei 20 mmol, als auch bei 40 mmol KNO_3-Zusatz pendelte sich das PCV nach 18 Wochen im Schnitt auf ca. 28% ein.
Der Unterschied bei der Leitfähigkeit von fast dem doppelten Wert bei 40 mmol KNO_3, gegenüber 20 mmol KNO_3, resultiert aus der Tatsache, daß Nitrat als mengenmäßig größter Bestandteil im Medium, fast ausschließlich die Höhe der Leitfähigkeit bestimmt.
In unregelmäßigen Abständen wurde auch getestet, wie die NH_4-Mangelkulturen ß-MDt umsetzten.
Zwischen beiden Nitratkonzentrationen bestand kein Unter-

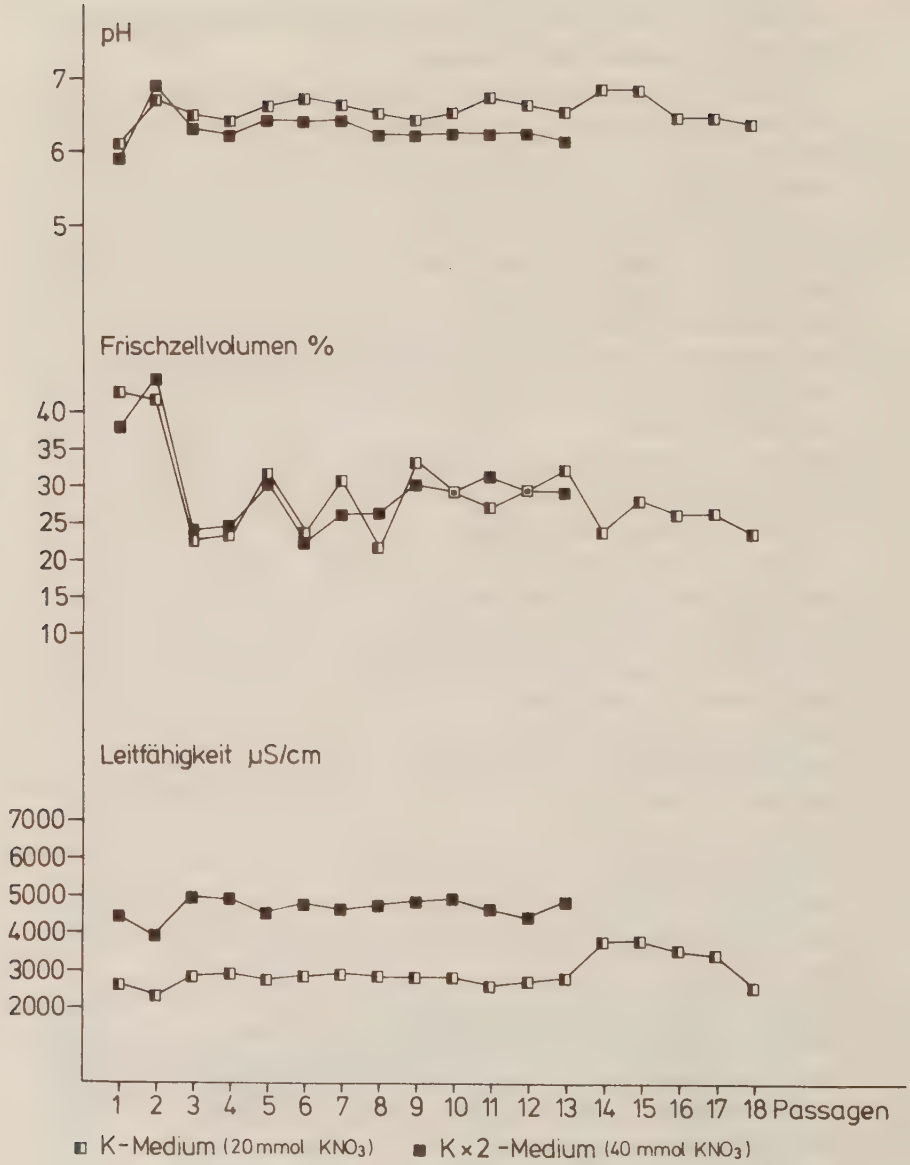


Abbildung 43: Kultivierung einer Digitalissuspensionskultur auf einem ammoniumfreien Medium mit 20 und 40 mmol KNO_3, die Werte sind am Passagenende gemessen

schied in der Umsatzrate. Bis zu 80 mg/l ß-MDt wurde alles in einer Passage (1 Woche) umgesetzt.

13.2 MS-Medium mit je 20 mmol und 40 mmol NH_4-N und NO_3-N

Hier wurde den Zellen Ammonium zusammen mit Nitrat als NH_4NO_3 angeboten, ohne den, in der MS-Vorschrift angegebenen, gleichzeitigen Zusatz von Kaliumnitrat.
Beim ersten Versuchsansatz wurden hier mit 20 mmol NO_3-N nur die Hälfte an Nitrat eingewogen, wie sonst in dem MS-Medium vorhanden ist (NH_4-Medium).
Bei dem NH_4 x 2-Medium wurde die Konzentration von 20 mmol NH_4NO_3 auf 40 mmol verdoppelt.
Mit 40 mmol NO_3-N war zwar jetzt die gleiche Nitratmenge im Medium wie in der MS-Salzlösung, aber hier nicht als Kaliumsalz, sondern als Ammoniumsalz.
Auch das Ammonium-ion war mit 40 mmol doppelt so hoch konzentriert wie im MS-Medium.
Zu Beginn des Versuchs wurde die Zellkultur vom MS-Vollmedium auf das Kaliumnitrat-freie Medium gesetzt.
Die Zellen verfärbten sich nicht und zeigten von Anfang bis zur 17. Woche, dem Versuchsende, gleichmäßig helle grobe Zellaggregate.
Der pH unterschied sich bei beiden Konzentrationen nicht wesentlich und lag leicht unter pH 4.
Das Frischzellvolumen schwankte zwischen 17% bis 25%.
Die Leitfähigkeit war wieder von der Konzentration an Nitrat abhängig: das Medium mit 40 mmol NH_4NO_3 hatte fast eine doppelt so hohe Leitfähigkeit wie diejenige mit 20 mmol NH_4NO_3.
Da das Frischzellvolumen so gering war, konnten kaum neue Subkulturen für den Hydroxylierungstest vermehrt werden. Deshalb wurde nur in größeren Abständen 40 mg/l ß-MDt zugegeben. Bei allen Versuchen wurde komplett alles ß-MDt umgesetzt.
Die Abbildung 44 zeigt den Adaptionsverlauf während 17 Wochen.

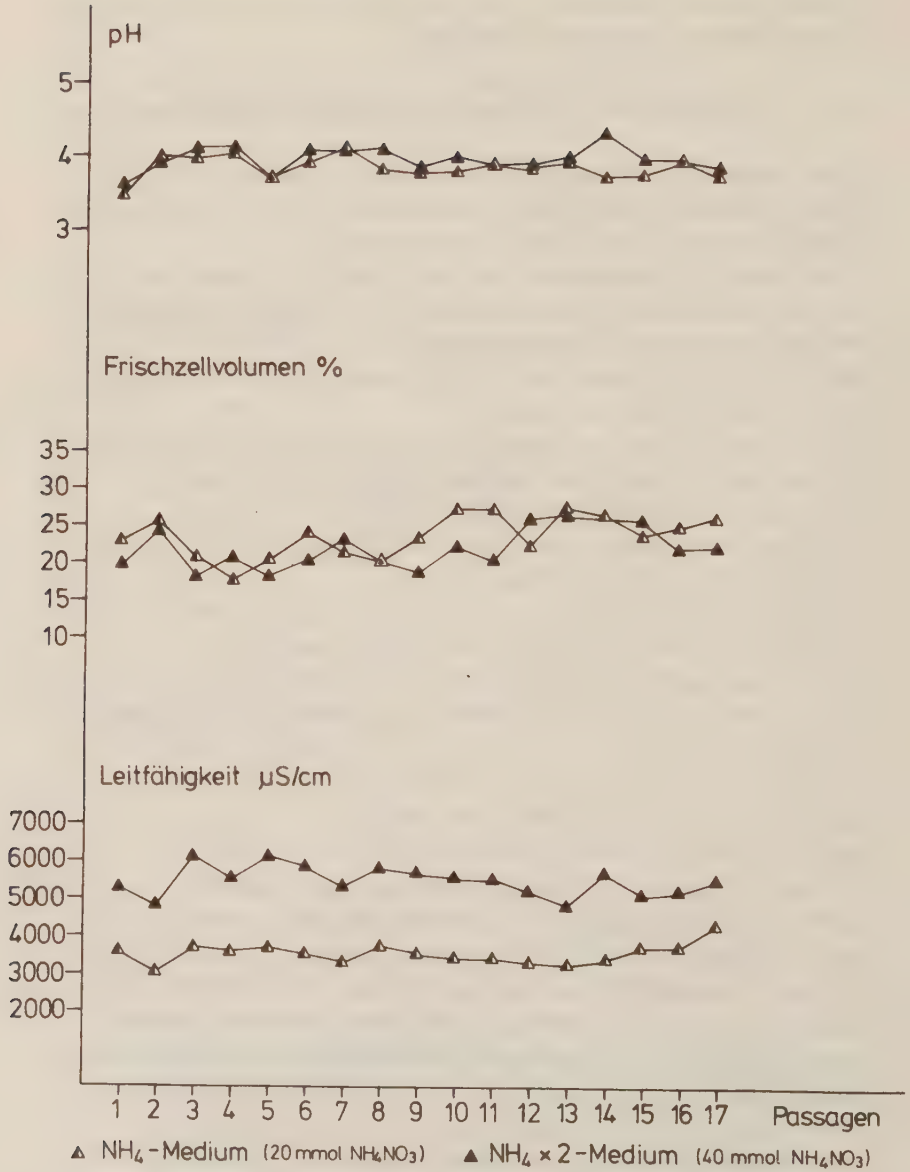


Abbildung 44: Kultivierung einer Digitalissuspensionskultur auf einem kaliumnitratfreien Medium mit 20 und 40 mmol NH_4NO_3, Werte vom Passagenende (nach 7 Tagen)

13.3 Ergebnisse und Diskussion

Vorweg zeigt Tabelle 23 wichtige Grunddaten.

Tabelle 23: Stickstoff-Konzentration, Leitfähigkeit und der pH der Medien mit verschiedenen anorganischen Stickstoffquellen

	MS-Med.	KNO_3-Medium	KNO_3 x2 Medium	NH_4NO_3 Medium	NH_4NO_3 x2-Med.
Kalium mmol	18,8	18,8	37,6	-	-
Ammonium mmol	20,6	-	-	20,6	41,2
Nitrat mmol	39,4	18,8	37,6	20,6	41,2
µS/cm im Medium	6010	3770	5520	3950	5860
µS/cm Passagenende	4290	2670	4400	3260	5270
pH im Medium nach dem Autoklavieren	4,9	3,8	3,7	3,7	3,8
pH am Passagenende	5,4	6,2	6,4	3,8	4,0

Aus der Leitfähigkeitsabnahme läßt sich auf den Nitratverbrauch und darüber auch auf das Wachstum schließen.
Das MS-Medium zeigte die größte Abnahme der Leitfähigkeit von 1720 µS/cm bei der Gesamt-ionenkonzentration und damit vor allem die Abnahme des Nitrats.
Beim NH_4 x 2-Medium war bei der Leitfähigkeit mit nur 590 µS/cm Unterschied zum Ausgangswert nach einer Woche, der geringste Verbrauch festzustellen.
Dagegen hatten beide NH_4/NH_4 x 2-Medien von 371 bzw.718 mg/l Ammoniumkonzentration 200 bzw. 254 mg/l davon verbraucht.
Obwohl die Gesamt-N-Konzentration im MS-Medium mit 60 mmol geringer als im NH_4NO_3 x 2-Medium mit 82 mmol lag, bestätigte sich auch hier wieder, daß die Ammoniumabsorption gegenüber der Nitrataufnahme eindeutig bevorzugt wird. Ausführlicher wird dieser Aufnahmeweg in Kapitel 10 bewiesen und erläutert.
Besonders auffällig waren die Unterschiede beim pH: Die Ammoniumnitratkulturen lagen mehr im sauren Bereich bei pH 3,6

bis 4,1; die Kaliumnitrat-Kulturen mehr im neutralen Bereich bei pH 6,1 bis 6,7.
Der Wechsel des pH-Wertes bis ins Alkalische beim Nitratverbrauch wird oft beobachtet und als Ergebnis des OH^-/NO_3^- -Austausches gedeutet (SMITH 1973).
Ähnliche Resultate, die sich auf die zugeführte Stickstoffart zurückführen lassen, beschreiben schon VELICKY und ROSE (1973) bei Karottenkulturen.
Die zu Beginn auftretende Rotfärbung des Mediums der Kulturen ohne Ammoniumzusatz, läßt auf eine unphysiologische Beeinträchtigung der Zellen schließen.
Die Kulturen, die dagegen beide Stickstoffarten in Form von NH_4^+/NO_3^- angeboten bekamen, blieben hell (NH_4/NH_4 x 2-Medium). Trotzdem zeigten diese Zellen ein schlechteres Wachstum gegenüber dem Vollmedium, bei dem Nitrat als Kaliumsalz verwendet wird. Auch die doppelte Menge NH_4NO_3 mit der gleichen NO_3-N-Konzentration wie im MS-Medium gleicht das fehlende Nitrat in Form des Kaliumsalzes nicht aus.
Daraus läßt sich folgern, daß Kalium in MS-Konzentation unbedingt notwendig ist, um ein gegenüber dem Vollmedium vergleichbares Wachstum zu erhalten. Wird es dagegen in höheren Konzentrationen zugegeben, wie Versuch 12.3 zeigt, hatte es eine baldige Zellyse zur Folge.
So kommt es zwar auch auf die Menge des Nitrats an, doch ist es genauso wichtig, mit welchem Kation es verbunden ist.
Schon in Kapitel 7 wurde durch PO_4^{3-}-Nachfütterungsversuche, einmal als Kaliumsalz und andererseits als Ammoniumsalz eindeutig dem K-Salz den Vorzug gegeben.
Der Kaliumverbrauch ist bei gleicher Ausgangskonzentration von 716 mg/l (18,8 mmol) beim KNO_3-Medium mit 333 mg/l nach einer Woche bedeutend höher, als beim MS-Medium, bei dem noch 566 mg/l aufzufinden sind. Hier bestätigt sich die Hypothese von YOSHIDA und SEKIGUCHI (1972), die annehmen, daß die Kaliumaufnahme in die Zellen durch eine hohe Ammoniumkonzentration im Medium gehemmt ist.(Vergleichende Beobachtung in Kap. 10.5)
Nur im MS-Medium ist Ammonium in einer so hohen Konzentration von 20 mmol enthalten; im White´schen und Heller´schen Medium

fehlt es sogar ganz. Aber ein Weglassen dieses Elementes führte bei Digitaliszellen zu einem geringeren Wachstum. Eindeutig wachsen die Kulturen in Gegenwart von Nitrat mit Ammonium als zusätzliche Stickstoffquelle kombiniert, besser als ohne Ammoniumstickstoff.
Schon 1968 hatten GAMBORG et al. Versuche mit Sojabohnen gemacht und festgestellt, daß diese Kulturen nicht alleine auf Nitratmedien wachsen, sondern zusätzlich noch Ammonium oder Harnstoff zum Wachsen brauchen.
Auch bei Kokoskulturen von EEUWENS (1978) ergab sich der gleiche Effekt.
Bei hoher Nitratkonzentration mit der richtigen Kombination an Ammoniumionen steigt die Aktivität der Nitratreduktase stark an, und trägt dadurch, daß sie der Pflanze notwendige Wachstumsstoffe zur Verfügung stellt, zur schnellen Teilung bei (OJIMA und OHIRA 1978).
Im Gegensatz dazu wächst Weizen auch bei Gabe von Nitrat als einzigste Stickstoffquelle (GAMBORG 1970).
Für die Biotransformation ergab sich kein Vorteil durch die Veränderung der N-Quelle und ihrer Konzentration.
Hingegen fanden FUJITA et al. (1981) eine nitrat-abhängige Shikoninproduktion in Lithospermumzellen. Sobald aber Ammonium zugegeben wurde, war damit die Sekundärstoffproduktion verhindert.
Beachtenswert ist, daß, obwohl bei den N-Mangelmedien durchweg ein geringeres Wachstum zu verzeichnen war, trotzdem alles zugesetzte ß-MDt bis zu 80 mg/l vollständig zu ß-MDg umgesetzt wurde.
Die Gewöhnung der Zellen an das KNO_3-Medium ohne NH_4NO_3, zeigte sich an den immer heller werdenden Überstand des Zellmediums.
Die Flexibilität in der Nutzung der Nahrungsbestandteile, kann man sich zunutze machen, um verschiedene Zellinien mit unterschiedlichsten Fähigkeiten zu isolieren.

14. Hydroxylierung in Abhängigkeit von der Einwaage und der Glucosekonzentration

14.1 Abhängigkeit der Hydroxylierung von der Einwaage

Um die lag-Phase beim Wachstum zu umgehen, und um zu testen, ob Methyldigitoxin schneller und besser umgesetzt wird, wenn gleich zu Beginn eine höhere Zellpopulation eingesetzt wird, wurde eine höhere Animpfdichte gewählt.
Je zwei Kolben mit 30 g bzw. 90 g Frischgewicht wurden einmal mit und einmal ohne ß-MDt angesetzt. 90 g ist die Menge, die meist am Ende einer Passage erreicht wurde (Verdreifachung des Frischzellvolumens).
Gleich am Umimpftag wurde den MDt-Versuchen 40 mg/l MDt zugegeben. Jeden zweiten Tag wurde eine Probe genommen und auf PO_4^{3-}, NH_4^+, Glucose und MDt-Umsatz geprüft.
Die verbrauchte Glucose wurde als 40%ige Lösung nachgefüttert. ß-MDt, in 80% Methanol gelöst, wurde so zugesetzt, daß der Spiegel von 40 mg/l möglichst nicht überschritten wurde.
Abbildung 45 zeigt die Lebensdauer und die Umsatzmenge an ß-MDt bei den beiden unterschiedlichen Einwaagen.
Die von 30 auf 90 g erhöhte Frischgewichts-Einwaage brachte nur in den ersten Tagen eine schnellere Hydroxylierungsgeschwindigkeit. Nach 7 Tagen nivellierte sich die Umsetzungsrate und lag am Ende des Versuches gegenüber dem Versuchsansatz mit der geringeren Einwaage um 47 mg/l MDg im Rückstand.
Mehr Zellen gleich zu Beginn verbrauchen das Nährstoffangebot auch schneller, als wenn sie erst langsam anwachsen.
So könnte die geringere Umsetzung von MDt zu MDg bei 90 g Einwaage auf einen Mangel an bald verbrauchten fermentaktiven Substanzen gedeutet werden.
Eine erhöhte Einwaage im Vollmedium wirkte sich eher hemmend auf eine gleichmäßig schnelle Hydroxylierung aus.

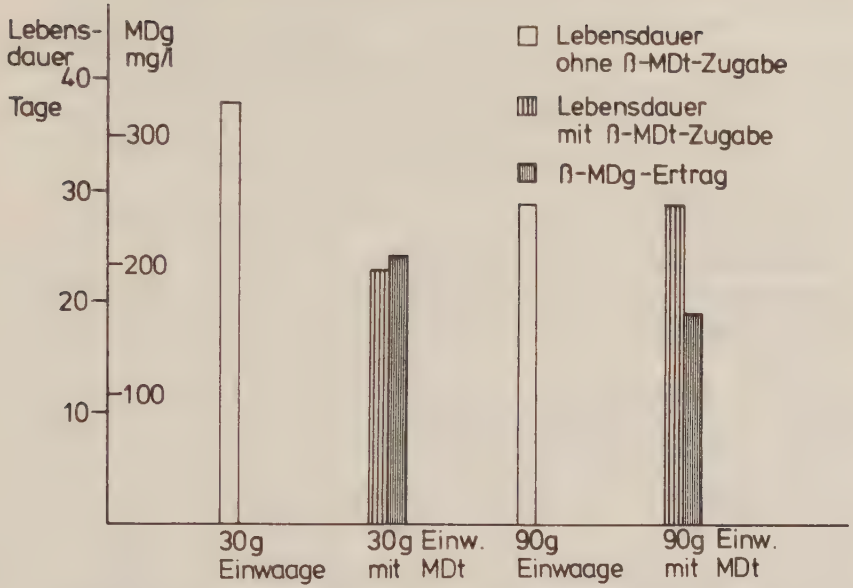


Abbildung 45: Lebensdauer und ß-MDg-Ertrag in Abhängigkeit der Frischgewichtseinwaage zu Versuchsbeginn, bei einer Digitalissuspensionskultur im 1 l-Kolben

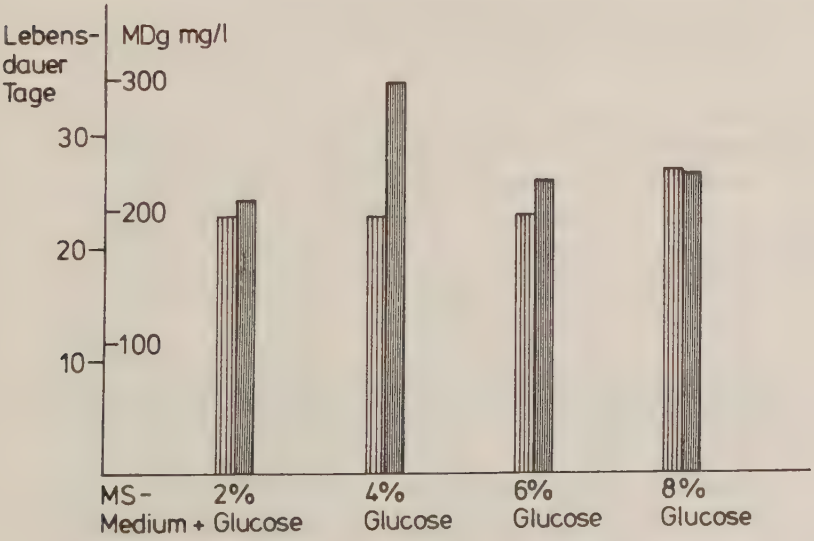


Abbildung 46: Abhängigkeit der Lebensdauer und des Biotransformationsertrages von der Glucosekonzentration

14.2 Änderung der Glucosekonzentration im Vollmedium

Glucose ist die Hauptenergie- und Kohlenstoff-Quelle, die im Nährmedium verwendet wird. Wie wirkt sich eine Erhöhung der Glucosemenge auf die Biotransformation der Zellen aus? Im folgenden Versuch wurde die Glucose-Ausgangsmenge von 2% bis 8% variiert.
In einer Blockübersicht wird in Abbildung 46 die Lebensdauer und die Hydroxylierungsmenge angegeben.
Bei 4% Glucosegehalt ist eine Steigerung um 86 mg/l ß-MDg, gegenüber der 2%igen Lösung in der gleichen Zeit von 23 Tagen zu sehen.
Noch höhere Glucose-Zusatzmengen von 6% und 8% zum Vollmedium lassen wieder fast keinen Unterschied zu dem üblichen Zusatz von 2% Glucose erkennen.
In Abbildung 47 ist der Glucoseverbrauch dieser 4 Versuche dargestellt.
Am schnellsten, innerhalb von 7 Tagen, war natürlich die 2% Glucose verbraucht, die daraufhin nachgefüttert werden mußte, dann nach fast der doppelten Zeit, nämlich in 13 Tagen, die 4% Glucose, und gleichmäßig nach weiteren 7 Tagen war die 6% Glucose am Nullpunkt. Nur bei dem Medium mit 8% wurde die Glucose bis zum Versuchsende nicht ganz verbraucht.

Bei dem normalen MS-Medium mit 2% Glucose ist Phosphat nach 5 Tagen verbraucht, bei dem 4% Glucosezusatz nach 7 Tagen, und bei dem Medium mit 6% nach 9 Tagen. Eine Ausnahme machte wieder der 8%ige Glucosezusatz. Dort war PO_4^{3-} schon nach 7 Tagen verbraucht.
Ammonium wurde unabhängig von der Glucosemenge innerhalb von 9 bzw. 11 Tagen vollständig konsumiert.

14.3 Hydroxylierung in reinen Glucoselösungen und mit Zusatz der Makroelemente

Eine Reduzierung des Nährmediums auf reine Glucoselösungen in unterschiedlicher Konzentration ohne Nährsalze wurde im folgenden Versuch getestet.

Ein Vorversuch mit 30 g Einwaage in 8%iger wässriger Zuckerlösung zeigte folgende Werte zu Beginn einer Passage:
Anfangs-PCV : 11,9%; pH : 4,2; Glucose : 8%; Leitfähigkeit : 410 µS/cm und am Ende der Passage:
End-PCV : 11,3%; pH : 3,93; Glucose : 7,5%; Leitfähigkeit : 37 µS/cm.
Eine so hohe Glucosekonzentration, und der daraus resultierende hohe osmotische Druck, übt einen stark hemmenden Einfluß auf das Wachstum aus. Die wenigen Salze, die noch aus der Vorkultur stammen, und die mit den Zellen übergeimpft worden waren, verschwanden fast ganz, was aus der geringeren Leitfähigkeit ersichtlich war.
Für die folgenden Versuche wurde gleich mit der dreifachen Menge des Ausgangsfrischgewichtes gearbeitet - 90 g.
Diese Menge wurde in reine wässrige Glucoselösungen von 2%, 4%, 6% und 8% eingewogen, denen zusätzlich gleich zu Beginn 40 mg/l ß-MDt zugegeben wurde.
Nach Umsetzung zu ß-MDg wurde der Zusatz so lange wiederholt, bis die Kultur rötlich wurde, was das Ende der Lebensaktivitäten anzeigte.
Dieses Ende trat bei allen 4 Konzentrationen am 19. Tag ein. Am gleichen Tag war sogar wieder Phosphat nachweisbar, was noch von der Vorkultur auf Vollmedium herrühren mußte und in den Zellen gespeichert worden war.
Einem Versuch wurde zusätzlich noch die MS-Konzentration an Makrosalzen zugegeben, was aber, wie aus Abbildung 48 ersichtlich ist, weder eine Steigerung der Lebensdauer, noch der Hydroxylierung bewirkte.
Das entnommene Probevolumen wurde entweder mit Glucoselösung, oder bei geringen Carbohydratbedarf mit Wasser wieder ergänzt.
In Abbildung 48 sind die vier Glucosekonzentrationen mit ihrer Lebensdauer und der ß-MDg-Menge aufgetragen.
Man sieht, daß die Steigerung der Hydroxylierung nicht kontinuierlich mit der Glucosemenge einherging, sondern sie stieg hier sprunghaft mit dem Zusatz von 8% Glucose an.
Bei der 8%igen Glucoselösung (Abbildung 49) war bis zum

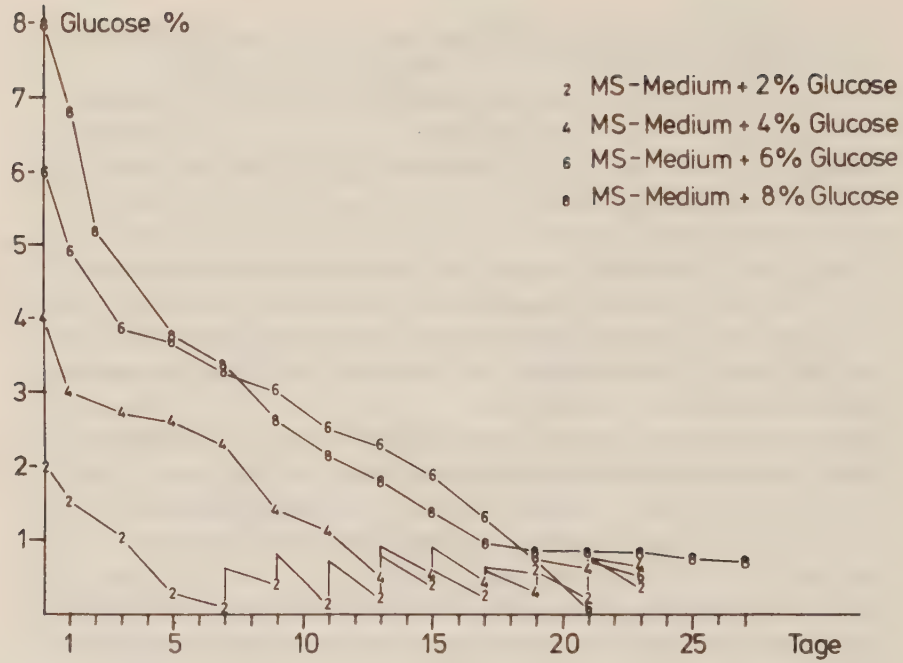


Abbildung 47: Glucosemetabolisierung im Vollmedium bei unterschiedlicher Glucoseausgangskonzentration von Suspensionskulturen von Digitalis lanata

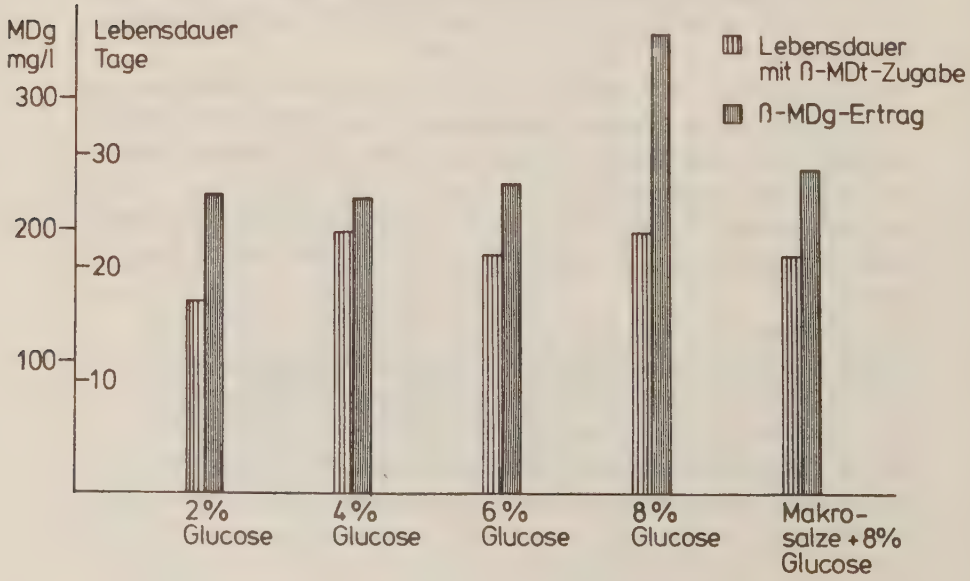


Abbildung 48: Biotransformationsertrag und Lebensdauer bei Kultivierung von Digitalis lanata Suspensionskulturen in Glucoselösungen verschiedener Konzentration, teils mit Zusatz von Makrosalzen

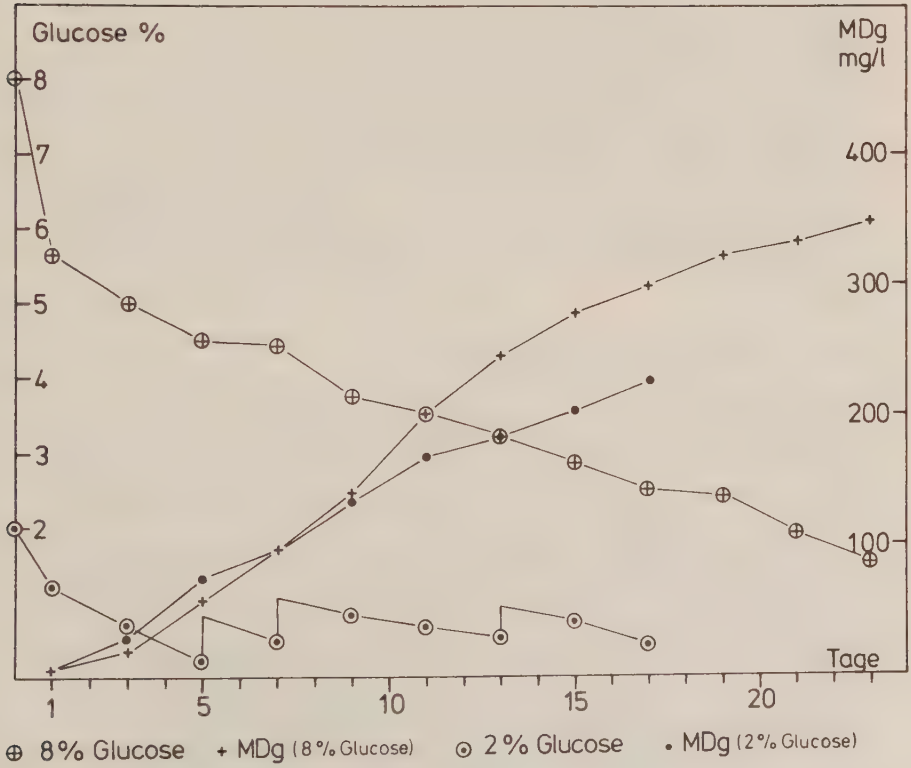


Abbildung 49: Biotransformationsverlauf und Glucosemetabolisierung bei Suspensionskulturen von Digitalis lanata auf 2% und 8% wässriger Glucoselösung

23. Tag noch nicht aller Zucker verbraucht, und Phosphat wurde aus den Zellen ausgeschleust. Es wurde auch kein MDt mehr umgesetzt. Von da an verfärbte sich das Medium und wurde leicht bräunlich und später rotbraun.
Bei der 2%igen Glucoselösung mußte schon am 5. Tag Zucker nachgefüttert werden (Abbildung 49), und bis zum 13. Tag wurde auch ein starkes Wachstum beobachtet.
Das Nullwachstum bei der 8%igen Glucoselösung hinderte die Zellen nicht daran, mehr MDg zu produzieren, als die wachsenden Zellen in der 2%igen Glucoselösung. Da man die Zellen während des Versuches nicht abernten konnte, um das Wachstum zu bestimmen, wurde wöchentlich das Abstzvolumen nach 10 min im Kolben markiert. Eine Änderung der Zellhöhe relativ zum Überstand wurde als Wachstum registriert.
Der Unterschied in der Zellzunahme in der 2%igen Glucoselösung im Vergleich zur 8%igen zeigt, daß das Wachstum und die Biotransformation sich in reiner Glucoselösung gegensätzlich verhalten.

14.4 Ergebnisse und Diskussion

Daß die Glucose-Konzentration einen großen Einfluß auf das Wachstum und den Sekundärstoffwechsel hat, zeigen schon ZENK et al. (1975 und 1977 a), IKEDA et al. (1976), DÖLLER (1978), KNOBLOCH und BERLIN (1980).
Bei den vorhergehenden Versuchen wurde gezeigt, inwieweit Glucose das Vollmedium ersetzen kann, ohne die Hydroxylierung zu beeinflußen.
In reiner 8%iger Glucoselösung fand kein Wachstum mehr statt, aber bei dem Vollmedium mit 8% Glucosezusatz wurde bis zum Versuchsende sogar noch Glucose nachgefüttert.
Es gibt zwei Wege der Glucoseverwertung, die Oxidation oder die Umwandlung zur Biomasseproduktion, die je nach dem metabolischen Zustand der Zellen eingeschlagen werden (FOWLER 1978).
1981 berichtete FUJITA, daß mehr als eine 5% Sucroselösung die Produktion von Shikonin in Lithospermumarten hemmte, aber auf das Wachstum keinen Einfluß hatte.

Selbst eine 8%ige Sucroselösung störte das Wachstum nur unerheblich.
Der bis 4% Glucose steigende Biotransformationsertrag sank durch Erhöhung der Glucosemenge von 6% auf 8% im Vollmedium. Eine Bestätigung findet diese Beobachtung bei IKEDA, MATSUMOTO und NOGUCHI (1976), die bei Nicotiana tabacum fanden, daß die Ubiquinonmenge bei der Sucroseerhöhung von 2% auf 5% sank.
Es gibt auch gegenteilige Aussagen, bei ZENK et al. (1977b), bei dem in Coleus blumei-Kulturen die Rosmarinsäure-Ausbeute bei 7% Saccharose am größten war, und der (1975) bei Morinda citrifolia bei Erhöhung der Saccharosemenge einen Anstieg der Antrachinonproduktion fand, während bei einem erhöhten Carbohydratgehalt das Frischgewicht und das Wachstum wieder absanken.
Die Biotransformation im Vollmedium mit unterschiedlicher Glucosemenge, zeigt außer beim 4% Glucosezusatz keinen großen Unterschied im ß-MDg-Ertrag.
Ganz anders sieht es aus, wenn man das Vollmedium ganz wegläßt, und nur die Glucose als Energiespender erhält.
Es ist wesentlich billiger, die Zellkultur nur in wässriger Glucoselösung fermentieren zu lassen, als im teuren MS-Medium.
Hier ließe sich ein Ansatzpunkt in der Trennung von Wachstumsmedium und Biotransformationsmedium finden.
Schon 1977 propagierten ZENK et al. die 2-Stufen-Kulturmethode, die sich in ein Anwachsmedium und ein Produktionsmedium auftrennt. Allerdings lassen sich im Produktionsmedium die Digitaliszellen nicht weiter verwenden.
Hier wäre eventuell ein zusätzlicher Weg frei zur Nutzung von immobilisierten Pflanzenzellen, die unterschiedlich lang in Vollmedium und Glucoselösung gehalten werden.
Der Zusatz der Makroelemente zur wässrigen 8%igen Glucoselösung bewirkt nicht die erwünschte Steigerung der Hydroxylierung, sondern war, im Vergleich zur reinen 8%igen Glucoselösung, im MDg-Ertrag um 100 mg/l niedriger.
Auch KNOBLOCH und BERLIN (1980) berichteten über eine Stei-

gerung der Alkaloidakkumulation in Catharanthus roseus-Zellen in reiner Saccharoselösung. Sobald aber Stickstoff und Phosphat enthaltende Elemente in MS-Konzentration zugegeben wurden, sank die Alkaloidakkumulation auf fast Null. Das bestätigt die Versuche mit der Zugabe der kompletten Makrosalz-Lösung, die die Biotransformation gegenüber der reinen Glucoselösung erniedrigten.

D Zusammenfassung der Ergebnisse

Es wurde gezeigt, daß durch den Übergang von der fluorimetrischen Auswertung der Herzglycoside im Medium zur HPLC-Methode eine verbesserte analytische Genauigkeit und große Zeitersparnis erreicht werden konnte.
Dadurch, daß zur Analytik nur noch eine geringe Probemenge notwendig war, konnten schon im Erlenmeyerkolben intensive Untersuchungen durchgeführt werden.

Beim Hochleistungsstamm 287 T, der bisher in Licht kultiviert wurde, gelang es zu zeigen, daß beim Übergang von Licht- zur Dunkelkultur die biosynthetische Zellaktivität erhalten bleibt und sogar verstärkt zu mobilisieren ist.

Es wurde versucht, den ß-MDt-Spiegel von 40 mg/l, in der Fermenterkultur, auf 20 mg/l zu senken, um eine Zellschädigung zu verringern. Dabei zeigte sich, daß dann aber auch nur die Hälfte an ß-Methyldigitoxin umgesetzt wird.

Mit einem ß-MDt-Spiegel von 40 mg/l und dem Stamm 287 T als Dunkelkultur, wurde eine weitere Steigerung der ß-MDg-Produktion von 475 mg/l auf 658 mg/l ß-MDg in Fermenterkulturen erreicht.

Das schnellere Wachstum bei Dunkelkulturen von Digitalis lanata wurde durch ein mit Phosphat angereichertes Medium weiterhin erhöht und kann so die Zeit für das scaling up bis hin zur Fermentation im industriellen Maßstab verkürzen.

Eine Nachfütterung von Phosphat als Ammonium- oder als Kaliumsalz erbrachte das Ergebnis, daß es in Bezug auf Zellwachstum günstiger ist, Kaliumphosphat nachzufüttern.

Weiterhin konnte das Medium dahin modifiziert werden, daß man die Zellkulturen an eine Nährlösung ohne Casein adaptieren konnte. Die Fermentationsdauer von üblicherweise 20 bis 30 Tagen konnte durch den oC-Stamm auf über 50 Tage erhöht werden.
Ein Biotransformationsversuch dieses Stammes erbrachte allerdings keine Erhöhung des MDg-Ertrages.
Eine Langzeitbeobachtung zeigte, daß es nicht möglich war, in einem Medium ohne Casein die Hydroxylierungsfähigkeit im Laufe mehrerer Subkulturen zu erhalten.

Eine Untersuchung über den Verbrauch der Makroelemente erbrachte im 1 l-Kolben, im 20 l-Fermenter bis hin zum 200 l--Fermenter eine gleichmäßig schnelle Abnahme von Phosphat, Ammonium und Sulfat.
Eine Auswahl an einfachen analytischen Methoden erlaubte es, aus kleinen Probemengen innerhalb eines Tages alle Makroelemente zu bestimmen.
Durch die genaue Kenntnis des Verbrauchs der Nährstoffe während einer Passage und einer Fermentation im 20 l und 200 l-Maßstab, ist eine kontinuierliche Fermentation mit Digitaliszellen näher gerückt.

Um ein jederzeit optimales Nährstoffangebot zu gewährleisten wurde versucht, die am schnellsten metabolisierten Bestandteile der Nährlösung während der Kultivierung nachzufüttern. Dabei kristallisierte sich heraus, daß die besten Ergebnisse mit einer Nachfütterung von KH_2PO_4 und NH_4NO_3 sowie Glucose erreicht wurden.

Ein Übergang von KNO_3 als Stickstoffquelle, zu einer Mischung aus KNO_3 und NH_4NO_3 bzw. die Verwendung verschiedener Konzentrationen dieser Salze erbrachte keinen Vorteil für die Biotransformation.

In einem Langzeittest, bei dem zunächst das verwendete MS-Medium mit dem Zusatz von Leitungswassersalzen hergestellt worden war, zeigte sich, daß auch eine Weiterkultivierung auf Leitungswasser, anstelle von bidestilliertem Wasser, ohne Verlust der Hydroxylierungsaktivität möglich ist.

Ein bemerkenswertes Ergebnis scheint die Fähigkeit von Digitaliszellen zu sein, sich auf reiner wässriger Glucoselösung kultivieren zu lassen, ohne daß, trotz Nullwachstum, die Biotransformationsfähigkeit Einbußen erlitt.
Eine 8%ige Glucoselösung zeigte die besten Ergebnisse.

Ausblickend kann gesagt werden, daß eine weitere intensive Forschungsarbeit auf dem Gebiet der pflanzlichen Zellkulturen, speziell mit Digitaliszellen, im Hinblick auf eine industrielle Produktion von Sekundärstoffen lohnend erscheint.

E Literaturverzeichnis

ALLISON, A.J., BUTCHER, D.N., CONOLLY, J.D., OVERTON, K.H.
Paniculide A, B and C, bisabolenoid Lactones from Tissue Cultures of Andrographis paniculata
Chem. Commun. 1493 (1968)

AVIV, D., GALUN, E.
Biotransformation of Monoterpenes by Mentha Cell Lines: Conversion of Pulegone to Isomenthone
Planta Med. 33, 70 (1978)

BARG, R., UMIEL, N.
Selection for Herbicicide Resistance in Tissue Culture and Phenotypic Variation among the Resistant Mutants
in: Alfermann, A.W., Reinhard, E., (eds.), Production of natural Compounds by cell culture methods, München 1978, Ges. Strahlen- und Umweltforschung, 337 (1978)

BERGMANN, L., BERGMANN, A.L.
Aktivierung der Biosynthese von Thiamin in Calluskulturen von Nicotiana tabacum im Licht
Planta 79,81 (1968)

BERTHELOT, P.
Répertoire de Chimie Pure et Appliquée 1, 284 (1859)

BUCKLAND, E., TOWNSLEY, D.M.
Coffee cell suspensione cultures. Caffeine and chlorogenic acid content
J. Can. Inst. Food Sci. Technol., 8, 164 (1975)

CORDUAN, G.
Syntesis of volatile oils in tissue cultures of Ruta graveolens
Planta Med. Suppl. 225 (1975)

Difco Manual of dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures
Difco Laboratories Detroit Michigan USA, 9. Ed. 266 (1953)

DÖLLER, G., ALFERMANN, A.W., REINHARD, E.
Produktion von Indolalkaloiden in Calluskulturen von Catharanthus roseus
Planta Med., 30, 14 (1976)

DÖLLER, G.
Influence of the Medium on the Production of Serpentine by Suspension Cultures of Catharanthus roseus (L.) G. Don.
in: Alfermann, A.W., Reinhard, E., (eds.), Production of natural compounds by cell culture methods, München 1978, Ges. Strahlen- und Umweltforschung, 109 (1978)

EEUWENS, C.J.
Effects of Organic Nutrients and Hormones on Growth and Development of Tissue Explants from Coconut and Date Palms cultured in vitro
Physiol. Plant 42, 173 (1978)

ERIKSON, T.,
Studies on the growth requirements and growth measurements of cell cultures of Haplopappus gracilis
Physiol. Plantarum 18, 976 (1965)

FILNER, P.
Regulation of inorganic Nitrogen and Sulfur Assimilation in Cell Suspension Cultures
in: Frontiers of Plant Tissue Culture 1978. Thorpe, T.A. (ed.), Calgary, Canada, University Press, 437 (1978)

FOWLER, M.W.
Regulation of Carbohydrate Metabolism in Cell Sospension Cultures
in: Frontiers of Plant Tissue Culture 1978, Thorpe, T.A. (ed.), Calgary, Canada, University Press, 443 (1978)

FRITZ, J.S., YAMAMURA, S.S.
Rapid Microtitration of Sulfate
Anal. Chem. 27, 1461 (1955)

FUJITA, Y., HARA, Y., SUGA, Ch., MORIMOTO, T.
Production of Shikonin Derivates by Cell Suspension Cultures of Lithospermum erythrorhizon. II.A new Medium for the Production of Shikonin Derivates
Plant Cell Reports 1, 61 (1981)

FURUJA, T., HIROTANI, M., SHINOHARA, T.
Biotransformation of Digitoxin by Suspension Callus Cultures of Digitalis purpurea
Chem. Pharm. Bull., Tokyo 18, 1080 (1970)

FURUYA, T., ISHII, T.
Verfahren zur Herstellung eines Saponine enthaltenden Ginseng-Medikamentes
German Patent Nt. 2143936 (1972)

GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K.
Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells
Exp. Cell Res. 50, 151 (1968)

GAMBORG, O.L.
The Effects of Amino Acids and Ammonium on the Growth of Plant Cells in Suspension Cultures
Plant Physiol. 45, 372 (1970)

GARVE, R., LUCKNER, M., VOGEL, E., TEWES, A., NOVER, L.
Growth Morphogenesis and Cardenolide Formation in Longterm Cultures of Digitalis lanata
Planta Med. 40, 92 (1980)

GOMORRI, G.
A Modification of the Colorimetric Phosphorus Determination for Use with the Photoelectric Colorimeter
J. Lab. clin. Med. 27, 955 (1942)

GRAVES, J.M.H., SMITH, W.K.
Transformation of Pregnolone and Progesterone by Plant Cells
Nature 214, 1248 (1967)

GRÜTZMANN, K.D., SCHRÖTER, H.B.
Abhdl. Deutsch Akad. Wiss. (Berlin)
Kl. Chem. 3, 347 (1966)

HABERLANDT, G.
Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen
Sitz.-Ber. österr. Akad. Wiss.,
Math.-naturwiss. Kl. 111, 69 (1902)

HAGIMORI, M., MATSUMOTO, T., YUKITERU, O.
Studies on the Production of Cardenolides by Plant Tissue Culture
Plant Physiol. 69, 653 (1982)

HAHLBROCK, K.
Further Studies on the Relationship between the Rates of Nitrate Uptake, Growth and Conductivity Changes in the Medium of Plant Cell Suspension Cultures
Planta 124, 311 (1975)

HAMMERSTEIN, F., KAISER, F.
Quantitative Direktauswertung von Arzneipflanzenextrakten auf Dünnschichtchromatogrammen
Planta Med. 21, 5 (1972)

HARTMANN, T.
Die Ammonium-Assimilation im N-Stoffwechsel der Pflanze
Biologie in unserer Zeit 1, 9 (1982)

HELLER, R.
Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro
Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg. 14, 1 (1953)

HELMBOLD, U.
Versuche zur Steigerung der 12 ß-Hydroxylierung von ß-Methyldigitoxin durch Fermenterkulturen von Digitalis lanata Zellstämmen
Dissertation Tübingen (1979)

HINZ, H., ZENK, M.H.
Production of Protoberberine Alkaloids by Cell Suspension Cultures of Berberis Species
Naturwissenschaften 67, 620 (1981) und unveröffentlicht (1982)

IKEDA, T., MATSUMOTO, T., NOGUCHI, M.
Effects of Nutritional Factors of Ubiquinone by Tobacco Plant Cells in Suspension Culture
Agr. Biol. Chem. 40,(9) 1765 (1976)

JENSEN, K.B.
Paper Chromatography of Cardiac Glycosides and Aglycones from Digitalis purpurea
Acta pharmacol. et toxicol. (Kopenhagen) 9, 99 (1953)

JONES, A., VELIKY, I.A., OZUBKO, R.S.
Biotransformation of Cardenolides by Plant Cell Suspension Cultures
Lloydia 41, 476 (1978)

KAISER, F.
Die papierchromatographische Trennung von Herzglykosiden
Chem. Ber. 88, 556 (1955)

KARTNIG, Th., RUSSHEIM, U., MAUNZ, B.
Beobachtungen über das Vorkommen und die Bildung von Cardenoliden in Gewebekulturen aus Digitalis purpurea und Digitalis lanata
Planta Med. 29, 275 (1976)

KATO, K., MATSUMOTO, T., KOIWAI, A., MIZUSAKI, S., NISHIDA, K., NOGUCHI, M., TAMAKI, E.
in: Technology Today, Terui, G. (ed.), Kyoto, Japan
Soc. Fermentation Technol. 689 (1972)

KAUL, B., STABA, E.J.
Dioscorea Tissue Cultures I. Biosynthesis and Isolation of Diosgenin from Dioscorea deltoidea Callus and Suspension Cells
Lloydia 31, 171 (1968)

KNOBLOCH, K.H., BERLIN, J.
Influence of Medium Composition on the Formation of Secondary Compounds in Cell Suspension Cultures of Catharanthus roseus (L.) G. Don
Z.Naturforsch. 35 c, 551 (1980)

KOCHBA, J., SPIEGEL-ROY, P., SAAD, S., NEUMANN, H.
Tissue Culture Studies with Citrus
in: Alfermann, A.W., Reinhard, E., (eds.), Production of natural compounds by cell culture methods, München 1978, Ges. Strahlen- und Umweltforschung, 223 (1978)

LEISTNER, E.
Isolierung, Identifizierung und Biosynthese von Antrachinonen in Zellsuspensionskulturen von Morinda citrifolia
Planta Med. Suppl. 214 (1975)

LEWIS, O.A.M., JAMES, D.M., HEWITT, E.J.
Nitrogen Assimilation in Barley in Response to Nitrate and Ammonium Nutrition
Annals of botany 1, 39 (1982)

LUCKNER, M.
Organogenese und Cardenolidbildung in Gewebekulturen von Digitalis
Deutsche Apotheker Zeitung 41, 2140 (1982)

MITRA, G.C., KAUL, K.N.
In Vitro Culture of Root and Stem Callus of Rauvolfia serpentina Benth. for Reserpine
Ind. J. Biol. 2, 49 (1964)

MIZUSAKI, S., TANABE, T., NOGUCHI, M., TAMAKI, E.
p-Coumaroyl-putrescine, Caffeolyl-putrescine and Feruloyl-putrescine from Callus Tissue Culture of Nicotiana tabacum
Phytochemistry 10, 1347 (1971)

MURASHIGE, T., SKOOG, F.
A Revised Medium for Rapid Growth and Bio-assays with Tobacco Tissue Cultures
Physiol. Plant. 15, 473 (1962)

NAGEL, M., REINHARD, E.
Das ätherische Öl der Calluskulturen von Ruta graveolens L. I. Die Zusammensetzung des Öles
Planta Med. 27, 151 (1975)

NETIEN, MG., COMBET, C.R.
Séances Soc. Biol. Filiales 165, 103 (1971)

NOGUCHI, M., MATSUMOTO, T., HIRATA, Y., YAMAMOTO, K., KATSUYAMA, A., KATO, A., AZECHI, S., KATO, K.
Improvement of Growth Rates of Plant Cell Cultures
in: Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H., (eds.), Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application, Berlin - Heidelberg - New York 1977, Springer Verlag, 85 (1977)

NOLAN, R.A., NOLAN, W.G.
Elemental Analysis of Vitamin-Free Casamino Acids
Applied Microbiology 24,(2) 290 (1972)

OHIRA, K., YAMAYA, T., OJIMA, K.
J. Sci. Soil Manure Japan 47, 79 (1976)

OHIRA, K., IKEDA, M., OJIMA, K.
Thiamine Requirements of Various Plant Cells in Suspension Culture
Plant and Cell Physiol. 17, 583 (1976)

OJIMA, K., OHIRA, K.
Nutritional Requirements of Callus and Cell Suspension Cultures
in: Frontiers of Plant Tissue Culture 1978, Thorpe, T.A. (ed.), Calgary, Canada, University Press, 265 (1978)

PILGRIM, H.
"Cholesterol Side Chain Cleaving Enzyme" Aktivität in Keimlingen und in vitro kultivierten Geweben von Digitalis purpurea
Phytochemistry 11, 1725 (1972)

REINHARD, E.
Biotransformation by plant tissue culture
in: Tissue Culture and Plant Science 1974, Street, H.E. (ed.), London - New York - San Francisco, Academic Press 443 (1974)

REINHARD, E., BOY, H.M., KAISER, F.
Umwandlungen von Digitalis-Glykosiden durch Zellsuspensionskulturen
Planta Med. Suppl. 163 (1975)

RÜCKER, W., JENTZSCH, K., WICHTL, M.
Organdifferenzierung und Glycosidbildung bei Digitalis purpurea L.
Z. Phlanzenphysiol. 102, 207 (1981)

SAWICKI, C.R., SCARINGELLI, F.P.
Colorimetric Determination of Nitrate after Hydrazine Reduction to Nitrite
Mikrochem. J. 16, 657 (1971)

SCHUHKNECHT, W., SCHINKEL, H.
Beitrag zur Beseitigung der Anregungsbeeinflußung bei flammenspektralanalytischen Untersuchungen
Z. analyt. Chem. 194, 161 (1963)

SMITH, F.A.
The Internal Control of Nitrate Uptake into Excised Barley Roots with differing Salt Contents
New. Phytol. 72, 769 (1973)

STÖCKIGT, J., PAWELKA, K.H.
persönliche Mitteilung 1982

TABATA, M., OGINO, T., YOSHIOKA, K., YOSHIKAWA, N., HIRAOKA, N.
Selection of Cell Lines with higher Yield of secondary Products
in: Frontiers of Plant Tissue Culture 1978, Thorpe, T.A. (ed.), Calgary, Canada, University Press, 213 (1978)

TEUSCHER, E.
Probleme der Produktion sekundärer Pflanzenstoffe mit Hilfe von Zellkulturen
Pharmazie 28, 6 (1973)

TITTEL, G., WAGNER, H.
Nachweis von Bufadienoliden
Planta 39, 125 (1980)

TORREY, J.G.
Morphogenesis in Relation to Chromosomal Constitution in Long-term Plant Tissue Cultures
Physiol. Plant. 20, 265 (1967)

TULECKE, W., NICKELL, L.G.
Production of Large Amounts of Plant Tissue by Submerged Culture
Science 130, 863 (1959)

VELICKY, I.A., ROSE, D.
Nitrate and Ammonium as Nitrogen Nutrients for Plant Cell Cultures
Can. J. Bot. 51, 1837 (1973)

WAGNER, F., VOGELMANN, H.
Cultivation of Plant Tissue Cultures in Bioreactors and Formation of Secondary Metabolites
in: Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H., (eds.), Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application, Berlin - Heidelberg - New York 1977, Springer Verlag, 245 (1977)

WAHL, J.
Fermentation von pflanzlichen Zellkulturen und 12 ß-Hydroxylierung von ß-Methyldigitoxin durch Zellkulturen von Digitalis lanata
Dissertation, Tübingen (1977)

WEBER, N.
Metabolism of Cholesterol in Cell Suspension Cultures of Rape and Soya
Z. Pflanzenphysiol. 87, 355 (1978)

WEST, F.R., MIKA, E.S.
Synthesis of Atropine by Isolated Roots and Root-Callus Cultures of Belladonna
Bot. Gaz. 119, 50 (1957)

WHITE, P.R.
A Handbook of Plant Tissue Culture, Lancaster, J. Cattell, 227 (1939)

YAMAKAWA, T., KURAHASHI, O., ISHIDA, K., KATO, S., KODAMA, T., MINODA, Y.
Stability of Indole-3-acetic Acid to Autoclaving, Aeration and Light Illumination
Agric. Biol. chem. 43,(4) 879 (1979)

YOSHIKAWA, T., FURUYA, T.
Morphinan Alkaloid Production by Opium Poppy Suspension Cultures
in: Plant Tissue Culture 1982, Fujiwara, A. (ed.), Tokyo, Japan, Abe Press 307 (1982)

YOSHIDA, F.,SEKIGUCHI,,S.
Utilization of NO_3^-, NH_4^+ and Urea by Cultured Chlorophyllous Cells of Tobacco (Nicotiana glutinosa)
Bulletin of Faculty of Agric., Tamagawa Univ. 12, 1 (1972)

ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., SCHULTE, U.
Antraquinone Production by Cell Suspension Cultures of Morinda citrifolia
Planta Med. Suppl. 79 (1975)

ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., ARENS, A., STÖCKIGT, J., WEILER, E.W., DEUS, B.
Formation of the Indole Alkaloids Serpentine and Ajmalicine in Cell Suspension Cultures of Catharanthus roseus
in: Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H. (eds.), Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application, Berlin - Heidelberg - New York 1977, Springer Verlag, 27 (1977 a)

ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., ULBRICH, U.
Production of Rosmarin Acid by Cell Suspension Culture of Coleus blumei
Naturwissenschaften 64, 585 (1977 b)

ZENK, M.H.
Produktion von sekundären Pflanzenstoffen durch pflanzliche Zellkulturen
in: Alfermann, A.W., Reinhard, E., (eds.), Production of natural compounds by cell culture methods, München 1978, Ges. Strahlen- und Umweltforschung, 180 (1978)

ZENK, M.H.
The Impact of Plant Cell Culture on Industry
in: Frontiers of Plant Tissue Culture 1978, Thorpe, T.A. (ed.), Calgary, Canada, University Press, 1 (1978 a)

ZINK, M.W., VELIKY, I.A.
Nitrogen Assimilation and Regulation of Nitrate and Nitrite Reductases in Cultured Ipomoea Cells
Can. J. Bot. 55, 1557 (1977)

Lebenslauf

Am 23. Dezember 1950 wurde ich als drittes Kind des Apothekers Bernhard Barthlen und seiner Frau Dr. med. Marianne Barthlen, geborene Zeuschner, in Tübingen geboren.

Nach dem Besuch der Uhlandschule in Tübingen von 1957 bis 1962, trat ich in das Wildermuthgymnasium in Tübingen ein.
1965 wechselte ich in die Heimschule Kloster Wald, in Wald (Hohenzollern), wo ich am 7. Juli 1970 das Abitur ablegte.

Meine Ausbildung als Apothekerpraktikantin erhielt ich in der Brücken-Apotheke in Dusslingen und in der Adler-Apotheke in Michelstadt (Odenwald). Am 9. Oktober 1972 schloß ich mit dem Vorexamen in Darmstadt ab.
Anschließend war ich bis zum Beginn des Studiums als Apothekerassistentin tätig.

Im Wintersemester 1973/74 nahm ich in Tübingen das Studium der Chemie auf.
Im Wintersemester 1975/76 wechselte ich zum Pharmaziestudium in Tübingen über, legte dort am 5. September 1978 das Staatsexamen ab und erhielt danach die Approbation als Apothekerin.

Nach einem Aufenthalt als Austauschstudentin des IPSF in Malaysia, begann ich am 15. April 1979 mit der vorliegenden Dissertation unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. E. Reinhard am Lehrstuhl für pharmazeutische Biologie in Tübingen. Die praktischen Arbeiten hierzu beendete ich im Winter 1982.
Bis Ende August 1979 war ich als wissenschaftliche Hilfskraft, danach als wissenschaftliche Angestellte am pharmazeutischen Institut tätig.

Meine akademische Ausbildung verdanke ich:

H.P.T. Ammon, H. Auterhoff, R.-E. Bader, E. Bayer, M. Brendle
F. Gönnewein, E. Graf, J. Guglielmi, H. Hamacher, K.-A. Kovar
D. Krug, U. Kunze, E. Lindner, E. Müller, D. Oelkrug,
F. Oberwinkler, H. Pommer, E. Reinhard, W. Rüdorff, J. Schultz,
F. Seelig, W. Viebahn, W. Zeil.

Sprint-Druck GmbH
7000 Stuttgart 30
Wiener Str. 117
Tel. 0711/81 26 69

Sprint-Druck GmbH
7000 Stuttgart 30
Wiener Str. 117
Tel. 0711/81 26 69